
Orientierung und Analyse der Morphologie von Purpurmembran Monolagen – Wege zur Membranfusion

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Chemie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Michael Schranz

aus Marburg

Marburg an der Lahn 2010

Vom Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation
am _____ angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. N. Hampp (Philipps-Universität Marburg)

Zweitgutachter: Prof. Dr. L.-O. Essen (Philipps-Universität Marburg)

Tag der Disputation: _____

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Oriented Purple Membrane Monolayers Covalently Attached to Gold by Multiple Thiole Linkages Analyzed by Single Molecule Force Spectroscopy

M. Schranz, F. Noll, and N. Hampp

Langmuir **2007**, 23, 11134-11138.

Bending of Purple Membranes in Dependence on the pH Analyzed by AFM and Single Molecule Force Spectroscopy

R.-P. Baumann, M. Schranz, and N. Hampp

Phys. Chem. Chem. Phys. **2010**, accepted.

Surface-induced Denaturation of Purple Membranes

M. Schranz, R.-P. Baumann, and N. Hampp

2010, in preparation.

Abstract

Creatures are almost perfectly assimilated to their environment through evolutionary processes. This assimilation reaches from their outward appearance to complex metabolic processes. The technical application of biomaterials (biotechnology) and the imitation of successfully utilized principles of nature (bionic) is an important field of modern research.

Because of its astonishing stability against thermal and chemical stress BR is an excellent candidate for many technical applications. BR can be a prototype for the utilization of biomolecules. General prerequisites for the technical use of biomolecules are suitable procedures for the structuring and stabilization of the biomaterial. Another challenge is the creation of interfaces between biomaterial and conventional technology.

In this disputation techniques were elaborated which allow the structuring of purple membranes on solid substrates. Particularly the morphology of PM on different substrates was investigated and the orientation of the membranes and the fusion of PM to produce extended PM-monolayers were realized.

The bending of the Bacteriorhodopsin mutants D85N and D85T in alkaline solutions were examined by means of atomic force microscopy and single molecule force spectroscopy. The results confirm the model that M-state formation during the photocycle of BR causes an opening of the cytoplasmic half-channel which induces large scale bending of the membranes. The bending direction of the D85X membranes was identified by single molecule force spectroscopy and it was shown that the forces, which cause the bending of the membranes, are stronger than the interactions between PM and surface.

A new method to immobilize PM on surfaces in an oriented way was developed in this work. Genetically modified BR-Q3C which contains a thiole group in the N terminus was bound on ultrasmooth gold substrates. Because the N-terminus of BR-Q3C was accessible only from the extracellular membrane side, the membranes could be bound with their extracellular side covalently to the gold surface. The unspecifically bound oppositely oriented PMs could be removed, so that a highly oriented PM-monolayer was received. The side of the bound PM could be identified by single molecule force

spectroscopy. The results concluded a high degree of orientation of the PMs on the gold surface. The force curves taken on BR-Q3C showed an additional Peak which was caused by the gold-Cysteine connection. The unfolding of the Helix A could be analyzed for the first time with force spectroscopy experiments. Another result arose from the analysis of the force curves: The transmembrane α -Helices of some BR-monomers were not unfolded pairwise. These force curves resulted from unfolding the Helices A-C in a simultaneous process.

To fuse purple membranes on surfaces the influence of different substrates on the morphology of the membranes was examined. Surprisingly it was found that PM seems not to be structurally stable in general when adsorbed to a surface. On mica, which is used for most of the AFM imaging experiments with PM, time- and temperature-dependent denaturation was observed. The progression of the denaturation could be observed with molecular resolution.

The denaturation could be reduced by adjusting the interactions between PM and the support. Polyaspartic acid-coated mica and the substrates gold and silicon had a lower denaturing effect. The modified mica as well as gold and silicon were covered only sparsely with PM. The attractive and repulsive forces which take effect on adsorbed PM on surfaces are discussed in chapter 3.3.1. On the one hand these forces can lead to the denaturation of the sample; on the other hand they are necessary to hold the PM on the surface. It became apparent that only on untreated mica surfaces a sufficient high degree of coverage with PM was reached which allows the fusion of the purple membranes to a continuous monolayer.

Bleached purple membranes were adsorbed on mica and were regenerated with retinal. This approach led to a polycrystalline monolayer. 50-100 nm sized crystalline areas were imaged by AFM investigations with molecular resolution. Thereby the crystal structures of the ordered membrane parts were found to be distorted in comparison to each other. Time-dependent analyses showed the mobility of the areas within the membrane.

Improved methods to regenerate PM on mica surfaces were developed, while several factors, which had an effect on the regeneration of the membranes, were examined. It turned out that the ethanol which was used as a solvent of the retinal had a denaturing effect on the membranes. The regeneration without addition of retinal led to crystalline

areas with a diameter of several hundred nanometers. With the improved methods approx. 2/3 of the surface occupied with PM could be regenerated.

The results obtained in this work are relevant for many applications of Bacteriorhodopsin in which an orientation of PM or a contact of PM-monolayers with a substrate is necessary. A solution for the problem of the denaturation of PM was found by influencing of the surface interaction. Nevertheless, beside the denaturation the degree of coverage and the desorption of the membranes have to be considered. In general a suitable substrate must be chosen for interfaces between biomolecules and established technology, while all these factors are regarded. Further investigations of the complex interactions on surfaces are of interest to many areas of biotechnology - also proceeding improvement of the fusion of native PM could benefit from the knowledge gathered here.

Inhalt

1. Einleitung.....	1
1.1 Eigenschaften von PM und BR.....	1
1.2 Technische Anwendungspotentiale von PM und BR.....	10
1.2.1 Photochromie	10
1.2.2 Photoelektrizität	11
1.2.3 Protonentransport.....	12
1.2.4 Templat zur Anbindung von Biokomponenten	12
1.3 BR-Konformationsänderungen im Photozyklus: PM-Krümmung.....	13
1.4 Orientierung von PM auf festen Substraten	14
1.4.1 Methoden zur PM-Orientierung.....	14
1.4.2 Analyse der PM-Orientierung.....	15
1.5 Fusion von PM	17
1.5.1 PM-Fusion in vivo	17
1.5.2 Artifizielle Membranen.....	18
1.5.3 PM-Fusion in vitro.....	18
 2. Materialien und Methoden	 20
2.1 Chemikalien.....	20
2.2 Ultraglatte Substrate	20
2.3 Modifikation von Glimmer	20
2.4 Purpurmembranen	21
2.4.1 Orientierung von PM-Q3C auf Gold	21
2.4.2 Fusion von PM.....	22
2.4.2.1 Bleichen mit Hydroxylamin.....	22
2.4.2.2 Adsorption auf Glimmer	22
2.4.2.3 Regeneration	22

2.5 Analysemethoden	24
2.5.1 Rasterkraftmikroskopie (<i>atomic force microscopy</i> , AFM).....	24
2.5.2 Einzelmolekül Kraftspektroskopie	26
2.5.2.1 Prinzip der Kraftspektroskopie	27
2.5.2.2 Kraft-Abstands-Kurven	28
2.5.2.3 Fitten der Kraftkurven	29
2.5.2.4 Kraftspektroskopie an Purpurmembranen	30
2.5.2.5 Kraftspektroskopie aus dem <i>tapping mode</i>	33
3. Ergebnisse und Diskussion.....	35
3.1 pH-induzierte PM-Krümmung.....	35
3.2 Orientierung von genetisch-modifizierter PM	42
3.2.1 Immobilisierung von Q3C-PM auf TSG-Substraten	42
3.2.2 Analyse der Bindung mit Einzelmolekül Kraftspektroskopie	44
3.3 Fusion von PM	50
3.3.1 Stabilität von PM auf Oberflächen	50
3.3.1.1 Morphologie von PM auf Glimmer	51
3.3.1.2 Morphologie von PM auf Gold und Silicium	57
3.3.1.3 Morphologie von PM auf modifizierten Glimmersubstraten	59
3.3.1.4 Qualitative Analyse der Oberflächenkräfte	60
3.3.2 Bleichen von PM	66
3.3.3 Fusion durch Regeneration	69
3.3.3.1 Untersuchung von polykristallinen Membranen.....	71
3.3.3.2 Beeinflussung der Regeneration	72
4. Zusammenfassung und Ausblick.....	75
5. Literatur	78

1. Einleitung

Lebewesen sind durch evolutionäre Prozesse nahezu perfekt an ihre Umgebung angepasst. Die Anpassung erstreckt sich über alle Größenordnungen von der äußeren Form des Organismus bis zu komplexen Stoffwechselprozessen. Die technische Nutzung von Biomaterialien (Biotechnologie) und die Nachahmung von erfolgreich in der Natur angewendeten Prinzipien (Bionik) ist ein wichtiger Zweig der modernen Forschung.

Zur technischen Anwendung in der Biotechnologie kamen bisher vor allem Bausteine aus extremophilen Organismen, da sie den oft harschen Bedingungen in ihren Anwendungsbereichen standhalten können. So werden heute z.B. hitzebeständige Enzyme in Waschmitteln eingesetzt.

Purpurmembranen (PM) sind seit Jahrzehnten ein wichtiger Forschungsschwerpunkt, da dieses Protein Eigenschaften besitzt, die es für viele technische Anwendungen interessant macht. Dazu gehören die Photochromie und der lichtgetriebene Protonentransport. Außerdem ist PM gegenüber äußeren Einflüssen im Vergleich zu der Mehrzahl an Proteinen bemerkenswert stabil.

Diese Arbeit stellt Lösungsansätze für die Nutzbarmachung von PM vor. Dazu wurde die Stabilität der Membranen auf festen Oberflächen untersucht. Eine neue Methode zur orientierten Adsorption der Membranen wurde entwickelt und die Fusion von wenigen Mikrometer großen PMs zu größeren Monolagen aufgezeigt.

1.1 Eigenschaften von PM und BR

Zellmembranen stellen eine Barriere zwischen dem Zytosol und der Umgebung einer Zelle dar. Sie bieten Schutz vor äußeren Einflüssen, müssen aber auch einen kontrollierten Stoffaustausch mit dem extrazellulären Bereich durch Transportproteine und Kanäle zulassen. In die Membran integrierte Sensoren geben der Zelle Informationen über ihre äußere Umgebung wie z.B. über die Konzentration an Nährstoffen oder die Lichtverhältnisse. Auch die Energieumwandlung der Atmungskette findet in einer Zellmembran statt. Diese Funktionen machen

Zellmembranen und Membranproteine zu einem wichtigen Teil der Zelle, der durch intensive wissenschaftliche Forschung untersucht wird. Da Membranproteine ihre Funktion und Struktur meist nur in ihrer nativen Umgebung aufrechterhalten können, ist ihre Untersuchung im Vergleich zu wasserlöslichen Proteinen meist aufwendiger.

Photochrome Proteine enthalten ein Chromophor, das mit elektromagnetischer Strahlung des sichtbaren Wellenlängenbereichs wechselwirken kann. Das angeregte Protein kann die aufgenommene Energie entweder nutzen, um ein Signal in der Zelle zu erzeugen (Sensor) oder sie photosynthetisch in chemische Energie umzusetzen. Für diese Funktionen hat die Evolution mehrere Wege gefunden: Chlorophyll dient in Pflanzen als Photosynthesepigment, während in Archaea Bakteriorhodopsin (BR) synthetisiert wird. Neben BR besitzen Archaea mit Halorhodopsin (HR, lichtgetriebene Chloridpumpe) und den beiden Sensorrhodopsinen (SR I und SR II, Lichtsensorproteine) drei weitere photochrome Proteine [1, 2]. Das Chromophor von BR, HR, SR I und SR II ist Retinal und auch die Sekundärstruktur der Rhodopsine ist stark konserviert [1, 3].

Bakteriorhodopsin wurde 1971 von D. Oesterhelt und W. Stoeckenius entdeckt [4] und ist heute eines der am besten charakterisierten Membranproteine. BR wird im extremophilen Archaeobakterium *Halobacterium salinarum* synthetisiert. Das Halobakterium hat in einer ökologischen Nische überlebt: Es gedeiht in Salinen und Salzseen mit einer Salzkonzentration von ca. 4 M. In sauerstoffarmer Umgebung werden bis zu 80% der Zellmembran des Halobakteriums mit BR-haltiger Purpurmembran (PM) bedeckt. BR ist eine lichtgetriebene Protonenpumpe – es ermöglicht dem Archaeon in anaerober Umgebung auf photosynthetischem Weg Energie zu erzeugen. Das Protein besteht aus sieben transmembranen α -Helices, die eine Pore bilden, in deren Mitte das Chromophor Retinal gebunden ist (Abb. 1.1). Wird das Chromophor durch Absorption eines Photons isomerisiert, durchläuft BR einen Photozyklus durch den der Ursprungszustand wiederhergestellt wird, während ein Proton von der zytoplasmatischen auf die extrazelluläre Seite gepumpt wird. Der so aufgebaute Protonengradient wird durch ATPasen in chemische, für den Zellstoffwechsel verfügbare Energie umgewandelt.

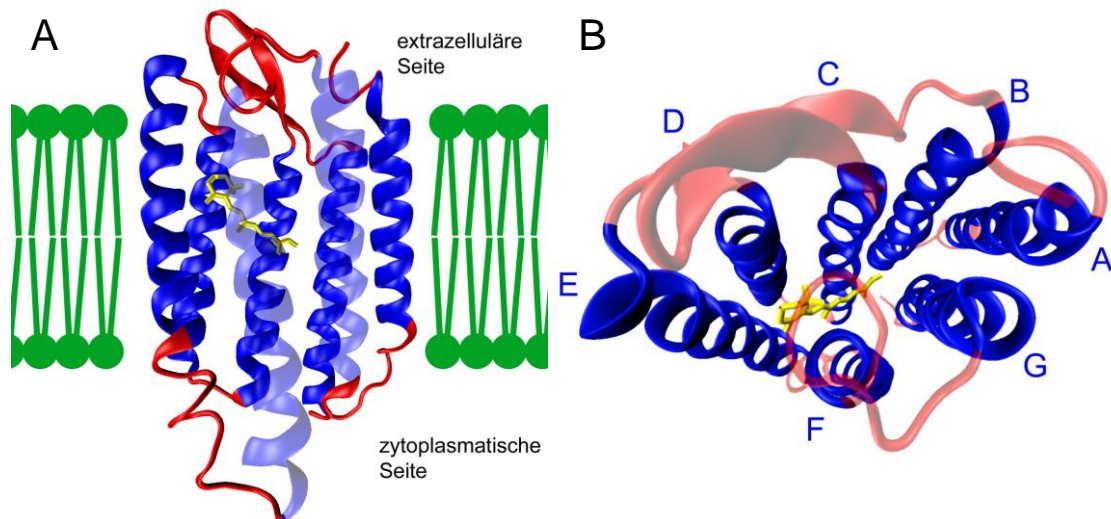


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Struktur von BR nach PDB-Eintrag 1FBB [5]. Die 7 α -Helices sind blau dargestellt, die interhelikalen Loops rot, das Retinal gelb und die umgebenden Lipide grün. **A)** Seitenansicht, **B)** Ansicht von der zytoplasmatischen Seite, die Helices sind mit A bis G gekennzeichnet.

Bakteriorhodopsin bildet Trimere aus, die in der Purpurmembran in einem hexagonalen zweidimensionalen Kristall angeordnet sind (Abb. 1.2). Diese kristalline Konfiguration sorgt für eine im Vergleich zu anderen Proteinen hohe Stabilität von BR gegenüber äußeren Einflüssen wie Temperatur [6], Lösungsmitteln [7] und pH-Wert [8]. Aus diesem Grund war BR das erste Membranprotein, dessen Struktur aufgeklärt wurde – dies gelang R. Henderson und P. N. T. Unwin bereits 1975 mittels Elektronenbeugung mit einer Auflösung von 7 Å [9]. Verfeinerte elektronenkristallographische Untersuchungen [10, 11] und Röntgenstrukturanalyse an 3D-Kristallen führten zu höheren Auflösungen und konnten zur weiteren Aufklärung des Protonenwegs beitragen [12, 13, 14].

Purpurmembranen können in alten Halobakterien mehrere μm groß werden. Innerhalb der PM ist BR das einzige Protein, es macht ca. 75 % der Masse der Membranen aus [15]. Die in PM enthaltenen Lipide sind vor allem Dietherlipide [15, 16, 17]. Pro BR-Monomer enthält PM ca. 10 Lipide [16].

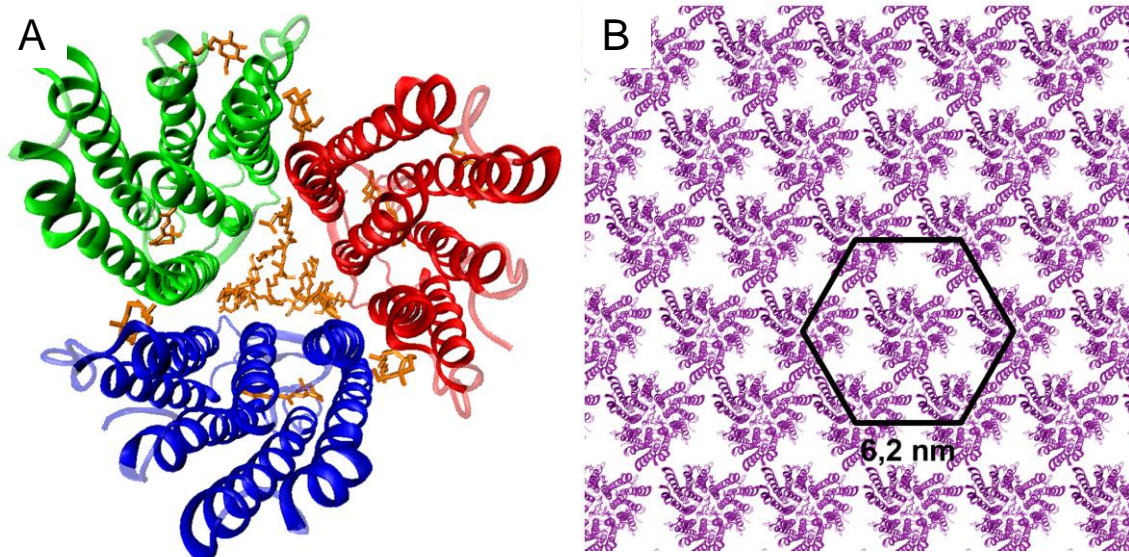


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Purpurmembran (Struktur der BR-Trimere nach PDB-Eintrag 1BRR [13]). **A)** BR bildet Trimere aus (rot, grün und blau), das Chromophor Retinal und die Lipide, von denen das Protein umgeben ist sind orange dargestellt. **B)** Die Trimere (Purpur) ordnen sich in einem hexagonalen 2D-Kristall an. Der Abstand der Mitte der Trimere beträgt 6,2 nm.

Das photochrome Membranprotein BR besteht aus 248 Aminosäuren, die sich zu sieben transmembranen α -Helices und einem β -Faltblattbereich im Loop zwischen den Helices B und C falten. Die Helices umschließen eine Pore in der Mitte des Proteins, die als Protonenkanal dient. Im Zentrum teilt das Chromophor Retinal, das an die Aminosäure K216 durch eine protonierte Schiff'sche Base gebunden ist, den Kanal in einen zytoplasmatischen und einen extrazellulären Bereich. Das Absorptionsmaximum des Retinals in BR liegt bei 570 nm. Freies Retinal zeigt jedoch - je nach Lösungsmittel - eine Absorption bei ca. 380 nm [18]. Dieser sogenannte Opsinshift kann durch die Bindung des Retinals und durch den Einfluss seiner Proteinumgebung erklärt werden. Die bathochrome Verschiebung wird vor allem auf das vermehrte Auftreten von aromatischen Seitenketten in der näheren Umgebung des Chromophors erklärt [19] (Abb. 1.3).

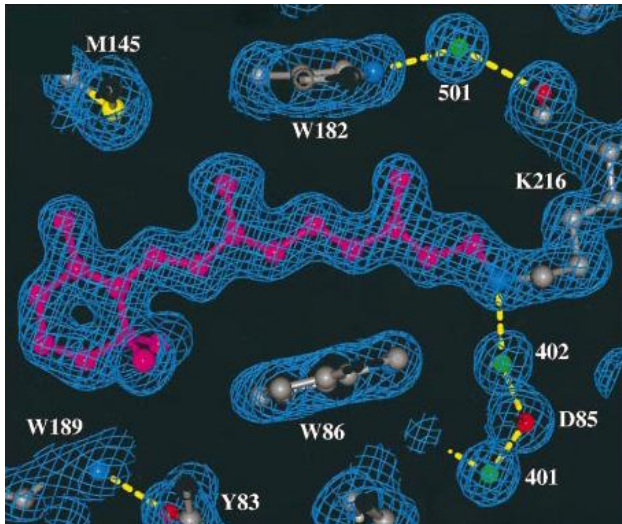


Abb. 1.3: Die Umgebung des Retinal in Bakteriorhodopsin. Die protonierte Schiff'sche Base wird durch die deprotonierte Aminosäure D85 stabilisiert. Drei Tryptophane (W86, W182 und W189) sind in der nahen Umgebung des Chromophors lokalisiert [aus 14].

Wird das Chromophor durch die Absorption eines Photons angeregt, durchläuft BR einen Photozyklus (Abb. 1.4), der im Folgenden Schritt für Schritt genauer beschrieben wird [Review: 20]. Nach dem IST-Modell kann der Photozyklus von BR als eine Abfolge von Isomerisierungen des Retinals (I), Änderungen der Zugänglichkeit des Retinals (*Switch*, S) und Ionentransportreaktionen (T) dargestellt werden [21]. Eine lichtinduzierte Isomerisierung wird mit I^* gekennzeichnet. Die spektroskopisch unterscheidbaren Zustände werden mit Großbuchstaben bezeichnet, der Index gibt die Wellenlänge des Absorptionsmaximums in Nanometer an.

$B_{570} \rightarrow J_{600}$ Das Chromophor Retinal absorbiert ein Photon (500-600 nm) und isomerisiert von der all-trans in die 13-cis,15-anti-Konformation (I^*).

$J_{600} \rightarrow K_{590} \rightarrow L_{550}$ Thermische Umlagerungen im Protein bereiten die Deprotonierung der Schiff'schen Base vor.

$L_{550} \rightarrow M_{410}^I$ Die Schiff'sche Base gibt ihr Proton in Richtung der extrazellulären Seite an den Aspartatrest 85 ab (T).

$M_{410}^I \rightarrow M_{410}^{II}$ Das Protein führt eine Konformationsänderung durch bei der sich Helix F auf der zytoplasmatischen Seite nach außen schiebt [5, 22]. Diese Strukturänderung führt dazu, dass die Schiff'sche Base vom zytoplasmatischen Halbkanal

zugänglich wird (S). Dieser Schritt ist der einzige irreversible im BR-Photozyklus. In einem zweiten Schritt gibt der *proton release complex* (PRC), der aus einem Wassernetzwerk besteht, ein Proton an das extrazelluläre Medium ab. Der Wasserkomplex wird von sechs Seitenketten und drei Gruppen des Proteinrückgrates stabilisiert (Tyr-57, Arg-82, Tyr-83, Glu-204, Glu-194, Ser-193, Pro-77, Tyr-79 und Thr-205) [23].

$M''_{410} \rightarrow N_{560}$ In diesem Schritt wird die Schiff'sche Base durch D96 reprotoniert (T).

$N_{560} \rightarrow O_{640}$ Das Aspartat 96 wird von der zytoplasmatischen Seite protoniert. Die reprotonierte Schiff'sche Base isomerisiert wieder in den all-trans Zustand (I).

$O_{640} \rightarrow B_{570}$ Der Grundzustand wird wiederhergestellt, indem D85 sein Proton an den *proton release complex* abgibt. Die Schiff'sche Base wird wieder von der extrazellulären Seite zugänglich (S).

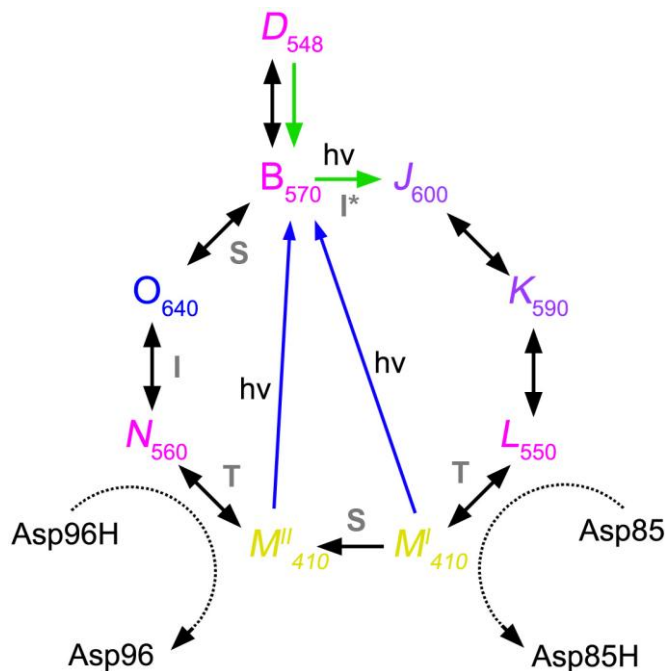


Abb. 1.4: Schematische Darstellung des Photozyklus von BR. Kursive Buchstaben bezeichnen die Intermediate, in denen das Retinal eine 13-cis-Konformation aufweist. Reversible Reaktionen werden mit Doppelpfeilen bezeichnet. Photochemische Reaktionen besitzen farbige Pfeile, während thermische Reaktionen mit schwarzen Pfeilen dargestellt sind. Graue Buchstaben bezeichnen die Prozesse nach dem IST-Model [21].

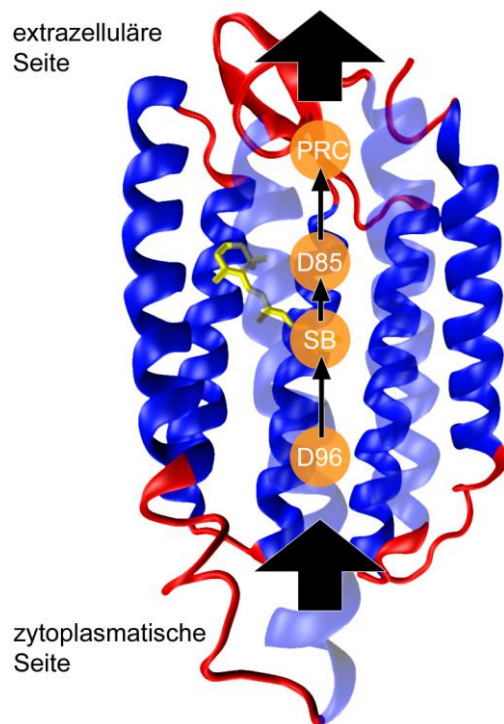


Abb. 1.5: Der Protonenweg durch die Pore des BR wird schematisch gezeigt. Die Schiff'sche Base (SB), die beiden an der Protonierung und Reprotonierung der Schiff'schen Base beteiligten Aminosäuren (D96 und D85) und der Proton-Release-Complex (PRC) sind schematisch eingezeichnet.

In Abbildung 1.5 ist der Protonenweg durch den Kanal des Bakteriorhodopsin schematisch gezeigt. Durch Punktmutationen an den Aminosäuren, die an der Weitergabe der Protonen beteiligt sind kann der Photozyklus beeinflusst werden. Die Mutante D96N, in der das Aspartat in Position 96 durch das neutrale Asparagin ersetzt wurde, durchläuft den Photozyklus verzögert. Der M-Zustand besitzt eine Lebensdauer von Sekunden statt Millisekunden wie im Wildtyp [24].

Mutationen der Aminosäure 85 resultieren in einer bathochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums. Diese „blauen Mutanten“ können abhängig von den äußeren Bedingungen mehrere Photozyklen durchlaufen [25, 26]. Die möglichen Photozyklen sind in Abb. 1.6 gegenübergestellt. Dabei kann von der BR-Mutante D85T (wie in Halorhodopsin) Chlorid auf die zytoplasmatische Seite gepumpt werden (Abb. 1.6D) oder der Protonentransport in die entgegengesetzte Richtung ablaufen (von der extrazellulären zur zytoplasmatischen Seite). Die Zyklen können ebenso wie der Photozyklus von BR-WT (Abb. 1.6A) mit dem IST-Modell beschrieben werden [21]. In BR-D85T wird die Deprotonierung der Schiff'schen Base verzögert. Die Deprotonierung (T) konkurriert mit der Konformationsänderung (S) des Proteins. Findet die Deprotonierung vor der Konformationsänderung statt, wird ein dem Wildtyp ähnlicher Zyklus durchlaufen; ein Proton wird von der zytoplasmatischen Seite zur extrazellulären Seite der Membran gepumpt (I*/T/S/T/I/S, Abb. 1.6A). Geschieht die

Konformationsänderung zuerst, wird die Schiff'sche Base von der zytoplasmatischen Seite zugänglich – das Retinal isomerisiert wieder in die all-trans Konformation, ohne dass ein Protonentransport stattfindet ($I^*/S/T/T/I/S$, Abb. 1.6B). Wird BR-D85T mit blauem und gelbem Licht bestrahlt, findet ein Protonentransport in die entgegengesetzte Richtung statt. Nach der Isomerisierung des Retinals durch gelbes Licht (all-trans \rightarrow 13-cis) (I^*) ändert das Protein seine Konformation (S). Die Schiff'sche Base ist nun von der zytoplasmatischen Seite zugänglich und gibt ein Proton in den zytoplasmatischen Halbkanal ab (T). Durch blaues Licht wird das Retinal in die all-trans Konformation überführt (I^*). Dieser Schritt entspricht dem „*blue light quenching*“ mit dem BR-WT aus dem M-Zustand durch blaues Licht in den B-Zustand überführt werden kann (blaue Pfeile in Abb. 1.4). Durch eine weitere Konformationsänderung wird die deprotonierte Schiff'sche Base von der extrazellulären Seite aus zugänglich (S). Durch Reprotonierung von der extrazellulären Seite wird der Ausgangszustand wiederhergestellt (T). Die Bestrahlung von BR-D85T mit gelbem und blauem Licht führt zu einem dem Wildtyp entgegengesetzten Protonengradient ($I^*/S/T/I^*/S/T$, Abb. 1.6C).

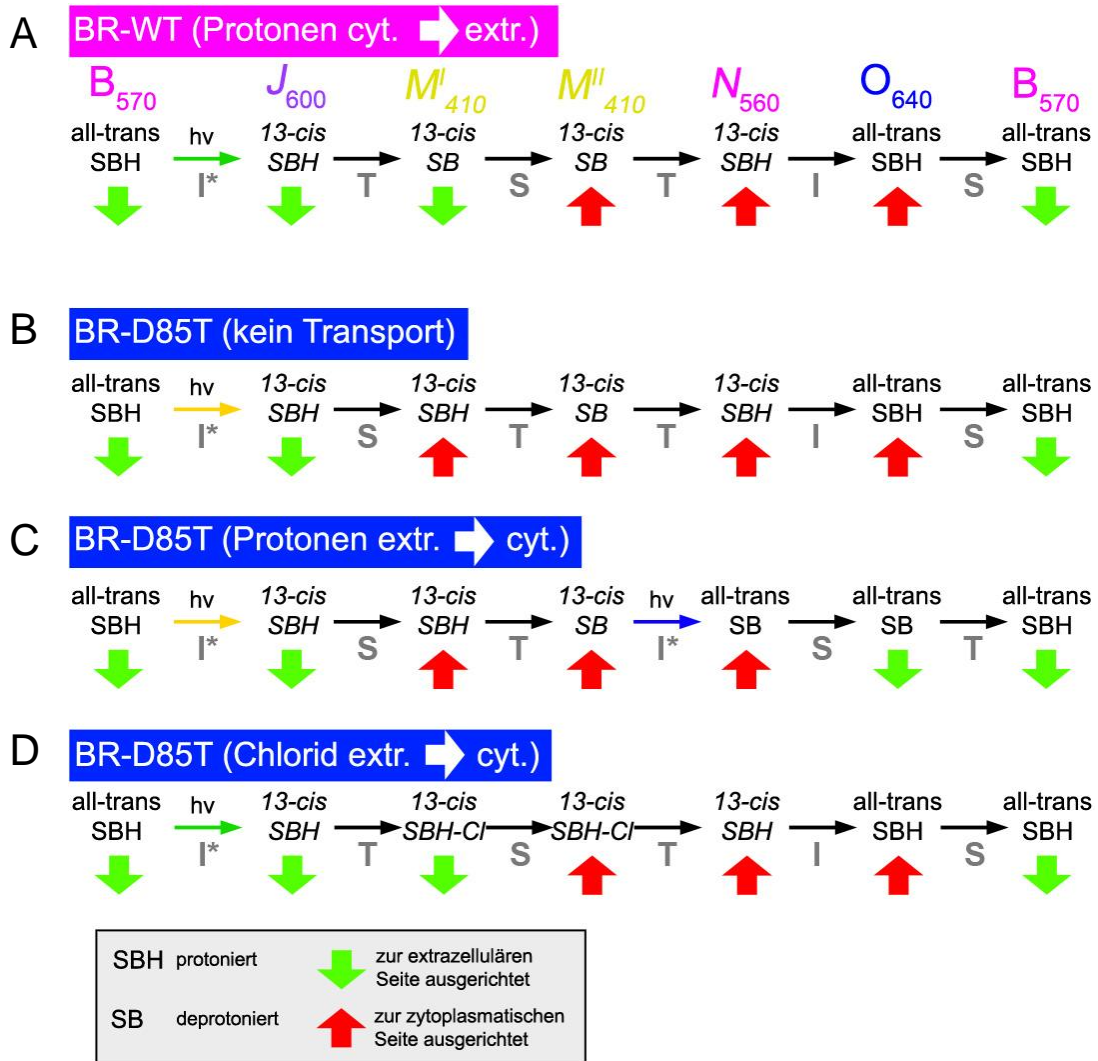


Abb. 1.6: Beschreibung der Photozyklen von BR-WT und BR-D85T nach dem IST-Modell [21]. **A)** BR-WT pumpt Protonen in Richtung der extrazellulären Seite. **B)** Findet in mit gelbem Licht bestrahltem BR-D85T der Switch vor der Deprotonierung der Schiff'schen Base statt, werden keine Protonen gepumpt. **C)** Mit gelbem und blauem Licht bestrahltes BR-D85T erzeugt einen zu A) entgegengesetzten Protonengradient. **D)** Nach demselben Verlauf wie in A) kann BR-D85T Chloridionen auf die zytoplasmatische Seite transportieren.

1.2 Technische Anwendungspotentiale von PM und BR

Durch seine große Stabilität gegenüber thermischen und chemischen Einflüssen eignet sich Bakteriorhodopsin besser als viele andere Biomoleküle für technische Anwendungen und kann so als eine Art „Prototyp“ für die technische Anwendbarkeit von Biomolekülen dienen [27-30]. In diesem Kapitel sollen mögliche Anwendungen und deren Voraussetzungen vorgestellt werden.

Grundsätzlich gibt es drei Anwendungsbereiche, die sich aus der molekularen Funktionalität des BR ergeben:

- Die Photochromie
- Der photoelektrische Effekt
- Der Protonengradient

Außerdem kann die Purpurmembran als Templat zur Anbindung von Biomolekülen und damit als ein Interface zwischen Festkörpern und Biokomponenten wie Proteinen dienen.

Für Photochrome Anwendungen eignet sich BR vor allem durch seine große Zahl an Schaltzyklen (Zyklizität), die konventionelle Farbstoffe bei weitem übertrifft. Generelle Voraussetzungen für die technische Anwendung von Biomolekülen sind geeignete Möglichkeiten zur Strukturierung und Stabilisierung des Biomaterials. Eine weitere Herausforderung stellt die Schaffung von Schnittstellen zwischen Biomaterial und herkömmlicher Technik dar.

1.2.1 Photochromie

Absorbiert BR ein Photon, durchläuft es mehrere spektroskopisch unterscheidbare Zustände (siehe Kap. 1.1). Der technisch nutzbare photochrome Effekt ist die Änderung der Farbe zwischen dem purpurnen B- und dem gelben M-Zustand, da der M-Zustand am langlebigsten und die Änderung der absorbierten Wellenlänge hier am größten ist. Wird die Mutante D96N eingesetzt, überdauert der gelbe Zustand mehrere Sekunden. Für die Anwendung als photochromes Farbpigment ist keine gerichtete Anordnung der

PMs nötig. Aus den Membranen können Tinten für Sicherheitsmerkmale hergestellt werden [31, 32].

Durch die kristalline Anordnung der BR-Trimere in der PM ergibt sich die Möglichkeit mit polarisiertem Licht nur einen Teil der Monomere anzuregen (Abb. 1.7). So können PM-Filme als anisotroper Datenspeicher genutzt werden [28].

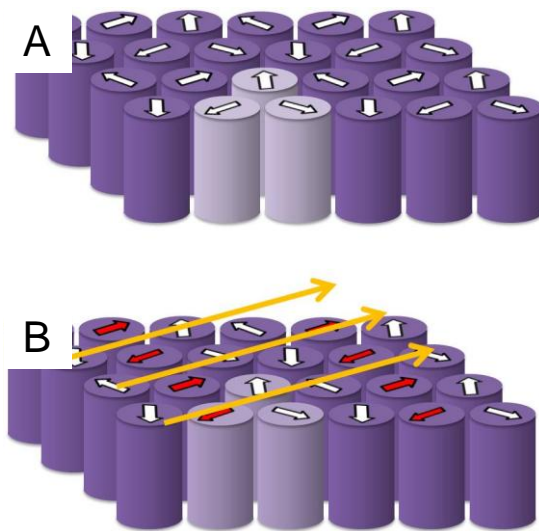


Abb. 1.7: Schematische Darstellung der anisotropen Datenspeicherung in BR. **A)** In Purpurchromophoren weisen die Chromophore (kleine weiße Pfeile) eine starke Anisotropie auf. Ein BR-Trimer ist heller dargestellt. **B)** Bei der Bestrahlung mit polarisiertem Licht (gelbe Pfeile) absorbieren nur die parallel zum elektrischen Feldvektor ausgerichteten Retinalmoleküle (kleine rote Pfeile) [nach 28].

Eine Nutzung als Langzeitdatenspeicher macht ein künstlicher Nebenzweig des Photozyklus möglich. Bestrahlt man BR mit intensiven Laserpulsen ($\lambda = 532 \text{ nm}$) erzeugt man einen blauen Zustand (LIBM = *Laser induced blue mebrane*), der nicht auf thermischem Weg zum Grundzustand relaxieren kann [33].

1.2.2 Photoelektrizität

Die Isomerisierung des Retinals durch die Absorption eines Photons aus dem Grundzustand führt zu einer Änderung des Dipolmoments im Protein. Pro BR-Monolage kann so eine Spannung von 250 mV erzeugt werden [28]. Ein photoelektrisches Signal ist nur messbar, wenn die Purpurchromophoren einen hohen Grad an Orientierung aufweisen. Da die Isomerisierung des Retinals im Bereich von Femtosekunden geschieht, ist dieser Effekt besonders für Anwendungen nützlich, die eine sehr schnelle Detektion von Licht erfordern. Mögliche Anwendungen des Photoelektrischen Effekts sind Lichtdetektion oder künstliche Retinas [34, 35].

1.2.3 Protonentransport

Schon kurz nach der Entdeckung von BR wurde die technische Ausnutzung des Protonengradienten, der durch die Purpurmembran produziert wird, postuliert [36]. Diese Anwendung konnte jedoch bisher nicht realisiert werden. Dies liegt an den immensen Voraussetzungen, die für die technische Nutzbarmachung des lichtgetriebenen pH-Unterschieds über die Purpurmembran nötig sind. Wie für die Nutzung der Photoelektrizität ist auch hier ein hoher Grad an Orientierung der Purpurmembranen nötig. Hinzu kommt ein bisher ungelöstes Problem. Um den Protonengradienten nutzen zu können darf die Membran keine Löcher enthalten, die einen Ausgleich des Protonengradienten durch Diffusion ermöglichen würden. Die natürliche Membrangröße (bis zu wenigen μm) ist zu klein für eine technische Nutzung. Um deutlich größere Flächen zu erhalten müsste man die kristallinen Membranen fusionieren. Eine weitere Herausforderung ist es, ein geeignetes Interface zwischen dem Protonengradienten und der auf Elektronen basierenden Elektronik zu schaffen.

1.2.4 Templat zur Anbindung von Biokomponenten

Eine weitere Anwendung von Purpurmembranen ist die Nutzung der BR-Monomere als Templat zur Anbindung von Biokomponenten [37]. Die Membran kann dabei als Interface zwischen z.B. einer Metalloberfläche und einem Biomolekül dienen und dieses gegen Denaturierung schützen. Auch für diese Anwendung ist ein hoher Grad an Orientierung der Membranen auf einer Oberfläche nötig.

1.3 BR-Konformationsänderungen im Photozyklus: PM-Krümmung

Will man Purpurmembranen auf festen Substraten immobilisieren, ist es von großem Interesse ihre Morphologie zu kennen. Nicht nur äußere Einflüsse wie Lösungsmittel und Temperatur können die Wechselwirkungen innerhalb der Membran und mit dem Substrat verändern, sondern auch ihre Krümmung.

Bereits 1987 stellten Czege und Rheinisch durch Lichtstreuungsexperimente eine Krümmung der PM während des Photozyklus fest [38]. Als Auslöser wurde eine durch den Protonentransport hervorgerufene unsymmetrische Ladungsverteilung angenommen. Vor einigen Jahren wurden elektrooptische Untersuchungen an der BR-Mutante D96N im M-Zustand durchgeführt [39]; die photoinduzierte Biegung der PM wurde jedoch nicht auf den Protonentransport sondern auf Änderungen der Tertiärstruktur im M-Zustand zurückgeführt. Eine Änderung der Tertiärstruktur der Monomere kann durch die feste Verbindung der Trimere im 2D-Kristall der PM zu einer makroskopischen Biegung der Membran führen. Zu dieser Interpretation gaben auch Kristallstrukturen Anlass [5, 12-14], auf die Czege und Rheinisch noch nicht zurückgreifen konnten.

Eine Analyse der PM-Krümmung mit Cryo-Elektronenmikroskopie wurde kürzlich durchgeführt [40, 41]. Dabei konnte sowohl die lichtinduzierte Krümmung der BR-Mutante D96N, als auch eine pH-induzierte Krümmung von BR-D85T enthaltenden Purpurmembranen nachgewiesen werden.

Die Biegrungsrichtung und die Kräfte, die zu der beobachteten Krümmung führen, konnten bisher nicht bestimmt werden. Für diese Untersuchungen eignen sich die Rasterkraftmikroskopie und die Einzelmolekül Kraftspektroskopie.

1.4 Orientierung von PM auf festen Substraten

Die orientierte Abscheidung von PM ist eine der Grundvoraussetzungen für viele technische Anwendungen von BR. Sowohl der photoelektrische Effekt als auch der lichtinduzierte Protonentransport von BR ist ohne eine Vorzugsorientierung der Membranen nicht nutzbar.

1.4.1 Methoden zur PM-Orientierung

Seit der Entdeckung der Purpurmbranen wurden viele Techniken entwickelt, die auf eine möglichst hohe Orientierung von PM-Fragmenten in Mono- oder Multilagen abzielen. Die Methoden lassen sich in drei Kategorien einteilen: 1) Die Membranen werden durch ein äußeres elektrisches Feld vororientiert und dann auf dem Substrat abgeschieden. 2) Der Ladungsunterschied der extrazellulären Seite gegenüber der zytoplasmatischen Seite der PM wird ausgenutzt. Durch gezielte Wahl der Oberflächenladung des Substrates und der Eigenschaften des Puffers werden die Wechselwirkungen zu einer der beiden Seiten verstärkt. 3) Eine Seite der PM wird so modifiziert, dass sie spezifisch mit der (modifizierten) Oberfläche wechselwirkt.

Zur ersten Kategorie gehört die elektrophoretische Abscheidung von PM [42-44]. In einem elektrischen Feld richten sich die Membranen aufgrund ihres Dipolmoments parallel zu den Feldlinien aus und werden auf einen festen Träger adsorbiert.

Die zweite Kategorie unterteilt sich in Langmuir Blodgett (LB) Techniken und der direkten Abscheidung von Purpurmbranen auf einer Oberfläche. Die LB Methode nutzt aus, dass Purpurmbranen an einer Luft-Wasser Grenzfläche orientierte Monolagen bilden, die durch Eintauchen auf einer Oberfläche abgeschieden werden können [45-47]. Auch die direkte Abscheidung von PM auf dem Substrat aus einer PM Suspension ist möglich. Negativ geladene Oberflächen werden in einem ersten Schritt mit einem Polykation beschichtet und dann in eine PM Suspension getaucht. Als Polykation wird z. B. Polylysin [48, 49] und PDAC (Poly(dimethyldiallylammonium chloride)) [50-52] verwendet. Durch abwechselndes Eintauchen in die Polykation Lösung und in die PM-Suspension können mit dieser Methode orientierte Multilagen erzeugt werden. Auf negativ geladenem Glimmer vermitteln positive Ionen (K^+ , Mg^{2+})

zwischen der negativ geladenen PM und der Oberfläche [53, 54]. Dabei ist meist die stärker negativ geladene zytoplasmatische Seite zum Puffer hin ausgerichtet. Sowohl die Langmuir Blodgett-Abscheidung als auch die direkte Abscheidung führen jedoch zu keinen zufriedenstellenden Ergebnissen, da der Ladungsunterschied zwischen extrazellulärer und zytoplasmatischer Seite nicht ausreicht um einen hohen Grad an Orientierung zu erreichen.

Die dritte Kategorie beinhaltet Methoden, bei denen eine Seite der Purpurmembranen gezielt modifiziert wurde, um spezifische Wechselwirkungen mit dem Substrat einzugehen. Koyama et al. ließen monoklonale Antikörper gegen die zytoplasmatische Seite der Purpurmembran in Mäusen produzieren. Die Antikörper wurden auf einer Oberfläche immobilisiert und ihre hohe Spezifität gegen Antigene auf der zytoplasmatischen Seite für die orientierte Anbindung von PM genutzt [55, 56]. Auch die Wechselwirkung zwischen Biotin-markierten Purpurmembranen und einer mit Streptavidin belegten Oberfläche führte zu einer orientierten Abscheidung von PM [57].

In dieser Arbeit wird ein neuer Ansatz vorgestellt: Genetisch modifizierte Purpurmembranen werden zur Orientierung auf einer Goldoberfläche genutzt.

1.4.2 Analyse der PM-Orientierung

Der Grad an Orientierung der Purpurmembranen ist nur mit großem experimentellen Aufwand messbar und wird mit unterschiedlichen Methoden durchgeführt. Indirekte Methoden umfassen die Messung des photoelektrischen Effekts oder des Photostroms einer PM-Monolage. Auch wenn diese Messparameter stark vom experimentellen Aufbau abhängen kann über die Stärke des Effekts auf die Orientierung zurückgeschlossen werden.

Eine genauere Bestimmung der Orientierung liefern bildgebende Verfahren. Die unterschiedlichen Varianten der Rasterkraftmikroskopie sind im Folgenden aufgelistet:

- AFM-Aufnahmen nach Markierung mit Antikörpern gegen eine der beiden Seiten [58, 59].
- AFM mit molekularer Auflösung [53]: Die BR-Trimere der beiden Seiten unterscheiden sich (Abb. 1.8). Die Unterscheidung ist jedoch schwierig, da die

BR-Trimere je nach Messkraft ein unterschiedliches Erscheinungsbild zeigen [60].

- AFM in niedriger Pufferkonzentration [61]: Die zytoplasmatische Seite erscheint höher als extrazelluläre Membranen, da die AFM-Spitze von der größeren Oberflächenladung stärker abgestoßen wird.
- Mit KFM-Aufnahmen (Kelvin Probe Force Microscopy) können die beiden Seiten aufgrund ihrer unterschiedlichen Ladung identifiziert werden [62].
- Einzelmolekül Kraftspektroskopie: Kraftkurven von der zytoplasmatischen und der extrazellulären Seite unterscheiden sich [63].

Ein Nachteil der AFM-Methoden ist, dass nur wenige Membranen gleichzeitig betrachtet werden können. Für statistische Aussagen über die Orientierung sind diese Methoden weniger geeignet, da die Probe nur stichprobenhaft untersucht werden kann. In dieser Arbeit wurden AFM-Aufnahmen mit molekularer Auflösung und Einzelmolekül Kraftspektroskopie zur Identifizierung der Membranseite benutzt.

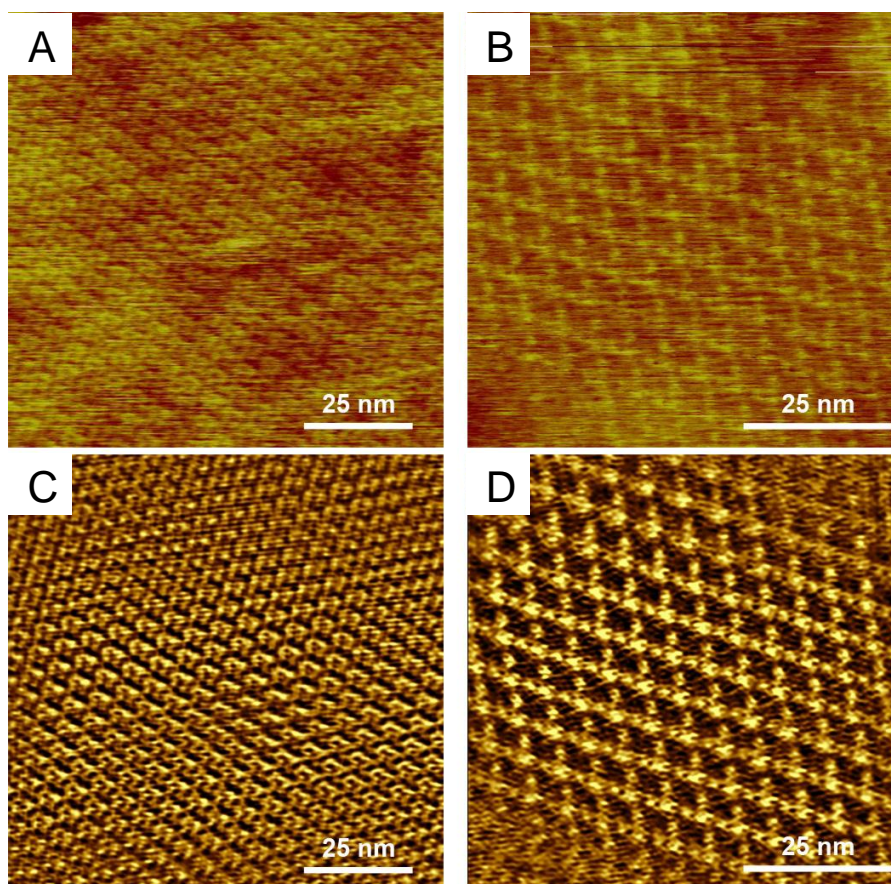


Abb. 1.8: AFM-Aufnahmen der PM auf Glimmer. **A)** Von der cytoplasmatischen Seite zeigen die BR-Trimere eine Donutform. **B)** Die Trimere der extrazellulären Seite zeigen eine Dreiecksform. **C)** und **D)** zeigen die beiden Aufnahmen nach FFT-Filterung.

1.5 Fusion von PM

Für technische Anwendungen der PM, die den lichtgetriebenen Protonengradienten ausnutzen, benötigt man eine möglichst ausgedehnte PM-Monolage ohne Löcher (siehe Kap. 1.2). Eine Möglichkeit solche Monolagen zu erhalten, wäre die Fusion von PM normaler Größe (bis zu wenigen μm) zu größeren Bereichen.

Die Fusion von nicht-kristallinen Lipidmembranen ist einfach: Stoßen zwei Membranen zusammen, fusionieren sie spontan angetrieben durch den hydrophoben Effekt. So werden z.B. auf einer Wasseroberfläche Langmuir Blodgett-Filme gebildet. Die kristallinen Purpurmbranen zeigen jedoch kein solches Verhalten, da die starre und dicht gepackte Anordnung der Trimere die Fusion erschwert. Um zu fusionieren müssten sich die Purpurmbranen drehen oder den Kristallverband (temporär) auflösen.

1.5.1 PM-Fusion in vivo

Werden Halobakterien unter anaeroben Bedingungen kultiviert, bilden die Bakterien in ihren Zellmembranen Bereiche aus, in denen BR zu einem hexagonalen 2D-Kristall angeordnet ist. Diese kleinen Purpurmbranen werden zu runden oder ovalen „Patches“ vergrößert. In alten Halobakterien, deren Membran fast vollständig mit BR belegt ist, wachsen einzelne Membranpatches zu größeren Membranen zusammen, die eine durchgehende kristalline Anordnung besitzen (Abb. 1.9). Zum Zusammenwachsen von Membranen mit unterschiedlich orientierten Kristallgittern müssen sich die Proteine von mindestens einer der beiden Membranen umorientieren. Es muss also eine Zwischenstufe geben, in der eine gemeinsame Membran mit zwei unterschiedlich orientierten Kristallstrukturen existiert. Neugebauer et al. zeigten durch elektronenmikroskopische Aufnahmen von älteren Membranen, dass diese Zwischenstufe existiert [64]. Durch Elektronenbeugungsexperimente wurden große Purpurmbranen entdeckt, die keine homogene Kristallstruktur aufwiesen (Abb. 1.9B). In noch älteren Kulturen von Halobakterien, fand man ausschließlich große Membranen mit einer durchgehenden Kristallstruktur (Abb. 1.9C). Der Mechanismus der Umorientierung ist bisher nicht geklärt.

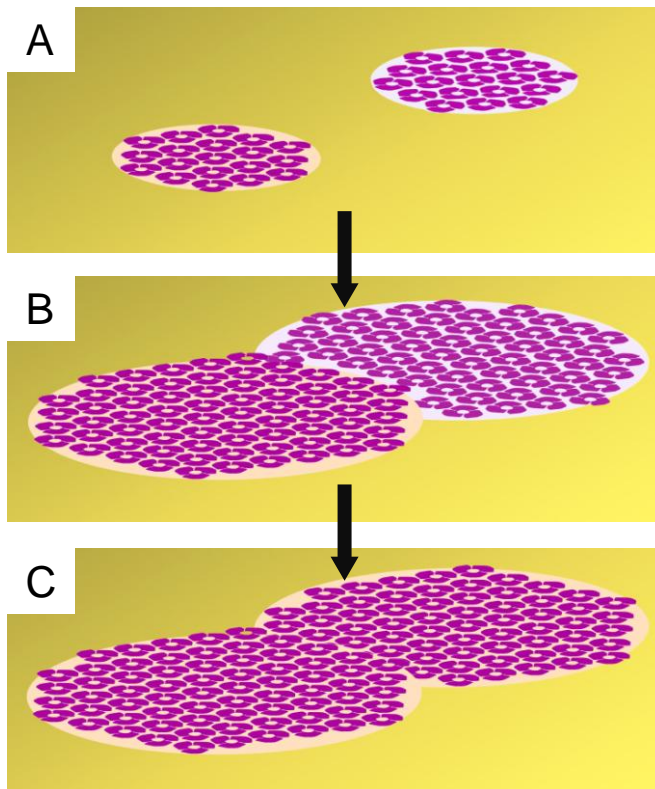


Abb. 1.9: Schematische Darstellung der Membranfusion im Halobakterium (die Zellmembran ist gelb dargestellt). **A)** Zwei benachbarte PM-Patches in jungen Halobakterien. **B)** Die Patches wachsen zusammen, besitzen aber noch zwei unterschiedlich orientierte Kristallstrukturen. **C)** Durch Umoorientierung von mindestens einer der Strukturen wird ein gemeinsamer 2D-Kristall ausgebildet.

1.5.2 Artificielle Membranen

Große BR-Monolagen können auch in künstlichen Lipidmembranen erzeugt werden [65-67]. Ein Nachteil dieser Methoden ist jedoch, dass die resultierenden Membranen meist nur partiell kristallin sind. Durch die modifizierte Lipidumgebung und das Fehlen der Kristallstruktur gehen die stabilisierenden Effekte verloren.

1.5.3 PM-Fusion in vitro

Durch die *in vivo*-Fusion ist die Größe der Purpurchromophore aufgrund der Abmessungen der Halobakterien auf einige μm beschränkt. Aus diesem Grund wird nach Wegen gesucht, mit denen deutlich größere Membranlagen erzeugt werden können. Einen Ansatz hierfür liefert die in dieser Arbeit vorgestellte *in vitro*-Fusion von PM auf festen Oberflächen.

Scheidet man PM aus einer Suspension auf einem Substrat ab, findet man viele Stellen vor, an denen zwei PM-Patches direkt nebeneinander liegen (Abb. 1.10A). Die

Membranen fusionieren jedoch nicht spontan. Um eine Fusion der Membranen zu erreichen müssten sich die 2D-Kristalle wie bei der *in vivo*-Fusion zueinander ausrichten. Ein Ansatz dieses Problem außerhalb des Halobakteriums zu lösen bietet das reversible Auflösen des 2D-Kristalls und spätere Rekristallisieren. Gibt man Hydroxylamin zu PM, wird die Schiff'sche Base zwischen dem Chromophor und dem Protein gelöst; die Membranen erscheinen nun farblos (Abb. 1.10B) [68, 69]. Ebenso wie Membranen aus Retinal-freien Stämmen [70] weisen auch diese sogenannten Apomembranen keine Fernordnung auf [69]. Durch Retinalzugabe können Apomembranen zu PM regeneriert werden [71, 72]. Dabei können benachbarte Membranen fusionieren (Abb. 1.10C).

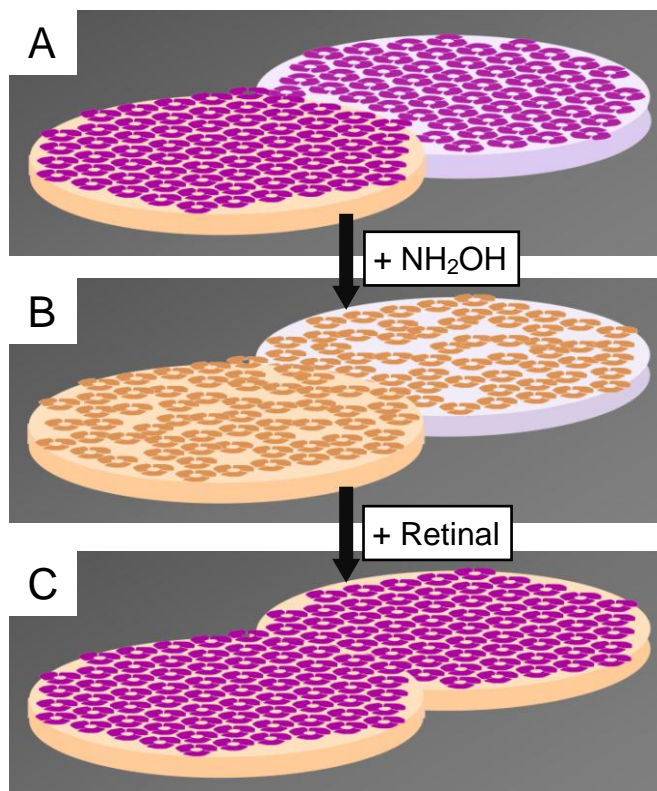


Abb. 1.10: Schema der Fusion zweier Purpurmembranen auf einer Oberfläche (grau). **A)** Zwei Membranen mit unterschiedlicher Orientierung des 2D-Kristalls liegen nebeneinander. **B)** Durch Zugabe von Hydroxylamin wird das Bakteriorhodopsin gebleicht. Die Trimere verlieren ihre hexagonale Ordnung. **C)** Das BR wird mit Retinal regeneriert. Die Trimere bilden einen hexagonalen 2D-Kristall, der sich über beide Membranen erstreckt.

2. Materialien und Methoden

2.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) oder Fluka (Buchs, Schweiz) bezogen und ohne weitere Aufreinigung eingesetzt.

2.2 Ultraglatte Substrate

Für die meisten Untersuchungen dieser Arbeit wurde das Schichtsilikat Muscovit Glimmer (Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) verwendet. Durch frisches Spalten des Glimmers vor der Anwendung erhält man eine saubere Oberfläche.

Template stripped gold-Substrate (TSG) wurden nach Wagner et al. hergestellt [73]. Auf frisch gespaltenen Glimmer wurde im Hochvakuum eine ca. 200 nm dicke Goldschicht gedampft. Mit Epoxidkleber wurde ein Glasplättchen auf die Goldschicht geklebt und nach dem Aushärten vom Glimmer-Templat abgezogen.

Silicium-Wafer (Wacker Chemie AG, Deutschland) wurden vor dem Gebrauch mit Piranha-Lösung (30% H_2O_2 , konz. H_2SO_4 1:2) gereinigt und mit destilliertem Wasser abgespült.

Glimmer, TSG und Si-Wafer wurden vor der Messung im Rasterkraftmikroskop auf eine Teflonscheibe und eine Stahlscheibe geklebt.

2.3 Modifikation von Glimmer

Belegung mit Poly-L-Lysin:

Frisch gespaltenen Glimmer wurde mit 40 μL 0,01%iger Poly-L-Lysin-Lösung (Poly-L-Lysin Hydrobromid, $M < 150000$, Sigma) 30 min inkubiert. Dann wurde die Probe mit Inkubationspuffer gewaschen.

Belegung mit Polyasparaginsäure:

Auf frisch gespaltenen Glimmer wurden 50 μL Inkubationspuffer gegeben, in den Puffer wurden 10 μL Polyasparaginsäure (Polyasparaginsäure Na-Salzlösung, 41,9%, Bayer) gespritzt und vermischt. Nach 30 minütiger Inkubation wurde mit Inkubationspuffer gewaschen.

2.4 Purpurmembranen

Die für diese Arbeit benötigten Purpurmembran-Suspensionen wurden von D. Oesterhelts Arbeitsgruppe (Max-Planck Institut für Biochemie, Martinsried, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die Aufreinigung geschah nach Standardprozeduren [74]; die Lagerung der Suspensionen erfolgte bei -20°C .

Zur Adsorption von PM auf einem Substrat wurde dieses wie in dem vorangegangenen Kapitel beschrieben vorbehandelt. Die konzentrierte PM-Stock-Suspension wurde mit Suspensionspuffer (150 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,2) auf eine OD von 0,2-0,3 des Absorptionsmaximums von BR verdünnt. Wenn nicht abweichend beschrieben, wurden 10 μL der verdünnten PM-Suspension zusammen mit 50 μL Inkubationspuffer (300 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,8) auf dem Substrat 20-30 Minuten inkubiert und gründlich mit Inkubationspuffer gewaschen.

2.4.1 Orientierung von PM-Q3C auf Gold

Die Cysteinmutante BR-Q3C wurde in einer Mercaptoethanol-haltigen Lösung gelagert. Mercaptoethanol bildet mit dem Cystein eine Disulfidbindung und schützt es so vor Oxidation durch Luftsauerstoff. Zur Entschützung wurde im ersten Schritt das überschüssige Mercaptoethanol durch zweimaliges Zentrifugieren und Waschen der Purpurmembranen entfernt. Im zweiten Schritt wurde das Pellet in einem phosphinhaltigen Puffer (1 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphin, Fluka, purum $\geq 98,0\%$ und 20 mM Natriumacetat bei einem pH-Wert von 4,5) [75] resuspendiert und 30 Minuten bei 40°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation erhielt man entschützte Purpurmembranen, die in Suspensionspuffer aufgenommen wurden.

Die entschützten Q3C-Purpurmembranen wurden sofort auf ein mit 50 µL Inkubationspuffer beschichtetes TSG-Substrat gegeben. Nach 20-30 minütiger Inkubation wurde nicht gebundene PM gründlich mit Inkubationspuffer abgewaschen.

2.4.2 Fusion von PM

2.4.2.1 Bleichen mit Hydroxylamin

Aus dem bei -20°C gelagerten Wildtyp-PM-Stock wurden 50 µL entnommen und auf 2 mL mit Suspensionspuffer aufgefüllt. Die Suspension wurde mit 20 µL Hydroxylamin (50%ige Lösung in Wasser) versetzt und mit Parafilm abgedichtet. Nach Belichtung mit einem Diaprojektor (150 W) über Nacht (ca. 16 h) erhielt man eine farblose PM-Suspension.

Durch zweimaliges Waschen mit Suspensionspuffer (Zentrifugation 2x 10 min bei 13000 rpm) wurde überschüssiges Hydroxylamin entfernt. Das Pellet nach der zweiten Zentrifugation wurde in 50 µL Suspensionspuffer aufgenommen, so dass man eine hochkonzentrierte Apomembran-Suspension erhielt.

2.4.2.2 Adsorption auf Glimmer

Frischgespaltener Glimmer wurde mit 10 µL Inkubationspuffer benetzt und 20 µL Apomembran-Suspension hinzugegeben. Nach 30 minütiger Inkubation im Dunklen wurde die Probe vorsichtig mit Inkubationspuffer gewaschen.

2.4.2.3 Regeneration

Mit Retinal:

Auf die mit 50 µL Inkubationsspuffer bedeckte Apomembranschicht wurden 5-10 µL Retinallösung gegeben (1% all-trans-Retinal in ethanolischer Lösung). Die Probe wurde 0,5 h bis 2 h bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert und vorsichtig mit Inkubationsspuffer gewaschen um das Ethanol zu entfernen. Die Adsorbierten

Membranen wurden über Nacht bei 60-65°C im Dunklen in Inkubationspuffer inkubiert. Nach dem Entfernen von nicht adsorbierten Membranen im Ultraschallbad (5,5 min), erhielt man eine regenerierte PM-Monolage auf Glimmer.

Ohne Retinal:

Auch ohne Zugabe von Retinal erhielt man regenerierte PM-Monolagen, da nach Entfernung des überschüssigen Hydroxylamins eine langsame Rückreaktion einsetzt, bei der das noch in der Membran gelöste Retinaloxim mit dem Lysin 216 des Bakterioopsin (BO) reagiert. Das oben angegebene Rezept wurde ohne den Schritt der Retinalzugabe durchgeführt.

2.5 Analysemethoden

Wie in Kapitel 2.4 beschrieben, wurden Purpurmembranen auf verschiedenen Oberflächen adsorbiert. Um die Morphologie der Membranen zu analysieren wurden rasterkraftmikroskopische Verfahren angewendet. Diese Abbildungsmethode hat mehrere Vorteile gegenüber der Abbildung mit dem Elektronenmikroskop: Die Probe kann direkt in einer Pufferlösung gemessen werden, die je nach Bedarf die natürlichen Verhältnisse im Halobakterium nachbilden soll oder deren Ionenstärke und pH-Wert über einen breiten Bereich eingestellt werden kann. Außerdem ist kein Bedampfen der Probe zur Kontrastverstärkung nötig.

Daher wurden alle Aufnahmen dieser Arbeit in wässrigen Pufferlösungen bei Raumtemperatur (wenn nicht anders angegeben) durchgeführt. Die Trocknung von Purpurmembranen führt zu Artefakten wie Rissen durch die Membranen [64, 76]. Durch sorgfältige Einstellung der Scanparameter sind gezielte Aufnahmen mit molekularer Auflösung von einzelnen Membranen möglich. Ein Nachteil aller bildgebenden Verfahren, bei denen das Untersuchungsobjekt auf einem Substrat adsorbiert werden muss, ist die Wechselwirkung zwischen Objekt und Auflage. Diese sind erwünscht um die Probe zu stabilisieren und machen die Messung so erst möglich, sie können aber auch die Struktur des Objekts beeinflussen oder es sogar zerstören (siehe Kap. 3.3.1).

Durch Einzelmolekül Kraftspektroskopie war es möglich weitere Informationen über die adsorbierten Purpurmembranen zu erhalten. So konnte z. B. die Orientierung einzelner Membranen auf dem Substrat bestimmt und die Wechselwirkungen zwischen PM und der Oberfläche an einzelnen BR-Molekülen analysiert werden.

2.5.1 Rasterkraftmikroskopie (*atomic force microscopy*, AFM)

Die AFM-Messungen wurden mit einem MultiMode-AFM (Veeco Instruments, Santa Barbara, USA), ausgestattet mit einem NanoScope IV-Controller und einem E-Scanner (Scanbereich: horizontal 15x15 µm, vertikal 3 µm) durchgeführt. Alle Messungen wurden in wässrigen Lösungen durchgeführt; wenn nicht anders beschrieben in Inkubationspuffer (300 mM KCl, 10 mM Tris*HCl, pH 7,8). Zu diesem Zweck wurde

eine Flüssigzelle als Halterung für die AFM-Spitze verwendet. Als Sonde kamen folgende AFM-Spitzen zum Einsatz:

- Olympus-Spitzen (Modell OMCL-TR400PSA-1, Cantilever und Tip Si_3N_4 , pyramidale Form, Oxidsharpend, Cantileverlänge 100 μm , Kraftkonstante 0,08 N/m; Olympus, Tokio, Japan)
- Veeco-Spitzen (Modell SNL-10, Si_3N_4 Cantilever, Si Tip, anisotrope Form, Oxidsharpend, Cantileverlänge 115 μm , Kraftkonstante 0,58 N/m; Veeco Instruments, Santa Barbara, USA).

Das AFM kann sowohl im Auflagemodus (*contact mode*) als auch im dynamischen Modus (*tapping mode*) betrieben werden; für eine ausführlichere Beschreibung der Funktionsweise des AFM und der Messmodi wird auf meine Diplomarbeit verwiesen [77]. Die gewählte Messmethode hängt von den Eigenschaften des Objekts und den Zielen der Messung ab. Der Auflagemodus zeichnet sich durch seine hohe Auflösung aus und wurde aus diesem Grund für den größten Teil der rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen von Purpurmembranen benutzt [78-83]. Die auf die Probe wirkenden Kräfte sind jedoch vergleichsweise hoch und müssen während der Messung ständig nachreguliert werden. Um molekulare Auflösung zu erreichen muss die Kraft zwischen Spitze und Probe im Bereich weniger hundert Piconewton liegen [60, 83]. Ist die gewählte Kraft höher, nimmt die Auflösung der Bilder ab. Bei sehr hohen Kräften oder auch bei längeren Messungen an einer Membran wird das Objekt häufig durch Scherkräfte zerstört [84]. Der *contact mode* wurde vor allem bei Aufnahmen verwendet, bei denen kleine Bereiche mit möglichst hoher Auflösung abgebildet werden sollten.

Im *tapping mode* wirken geringe Kräfte auf die Probe, Scherkräfte sind fast vollständig ausgeschlossen. Dadurch eignet sich dieser Modus für Übersichtsaufnahmen. Verringert man die Anregungsamplitude der Spitze, kann man auch mit dieser Methode molekulare Auflösungen erreichen [84-86]. Sehr weiche Proben wie z.B. denaturierte Purpurmembranen konnten nur im dynamischen Modus abgebildet werden. Auch Vorher-Nachher-Aufnahmen waren meist nur in diesem Modus möglich, da die Probe im *contact mode* sehr schnell zerstört wurde.

2.5.2 Einzelmolekül Kraftspektroskopie

In dieser Arbeit wurde Einzelmolekül Kraftspektroskopie mit dem MultiMode-AFM durchgeführt, dass zusätzlich zum Nanoscope IV-Controller mit einem PicoForce-Modul ausgestattet war. Als Sonden kamen die oben beschriebenen Olympus-Spitzen zum Einsatz. Der Piezoweg betrug 120 nm und die Annäherungs- und Rückziehgeschwindigkeit ca. 4 $\mu\text{m/s}$. Die AFM-Sonde wurde 0,2 s mit einer Kraft von ca. 1,2 nN auf die Oberfläche gedrückt.

Die Einzelmolekül Kraftspektroskopie (*single molecule force spectroscopy*, SMFS) beruht auf der Messung der Kräfte, die beim Annähern und Zurückziehen einer AFM-Spitze und einer Probe auftreten [Reviews: 87, 88]. Eine rauscharme Ausrüstung vorausgesetzt, können Kräfte im pN-Bereich gemessen werden. Die ersten kraftspektroskopischen Messungen wurden bereits 1994 durchgeführt. E.-L. Florin et al. konnten die Kräfte bestimmen, die zwischen einem einzelnen Ligand-Rezeptor-Paar wirken [89]. Im gleichen Jahr wurden Wechselwirkungen zwischen einzelnen DNA-Basen bestimmt [90]. Intramolekulare Kräfte konnten 1997 erstmals am Polysaccharid Dextran bestimmt werden [91].

Ein entscheidender Vorteil der Kraftspektroskopie ist die Messung von Kräften an einzelnen Molekülen. Gegenüber klassischen kalorimetrischen Verfahren, bei denen die Wechselwirkungen über ein ganzes Ensemble gemittelt werden, ist es mit dieser Methode möglich einzelne Moleküle zu untersuchen. Die Kraftspektroskopie ist gerade zur Analyse der Proteinfaltung und Entfaltung geeignet. Die ersten Messungen an Proteinen wurden an dem Muskelprotein Titin durchgeführt [92]. Das modular aufgebaute Protein entfaltet sich domänenweise, sodass die Kraftkurven einen sägezahnartigen Verlauf zeigten (Abb. 2.1). F. Oesterhelt et al. untersuchte im Jahr 2000 die Entfaltung des deutlich kleineren und nicht modular aufgebauten Proteins Bakteriorhodopsin mit kraftspektroskopischen Methoden [93]. Dabei zeigte sich, dass die Entfaltung der einzelnen Monomere zwar einem ähnlichen Grundmuster folgt, aber auch deutliche Unterschiede auftreten. Diese individuellen Resultate sind nur durch Experimente an einzelnen Molekülen zugänglich. Aktuelle Arbeiten beschäftigen sich auch mit der Rückfaltung von Proteinen. Diese Methode kann interessante Einblicke in Faltungsmechanismen von Proteinen geben. Gerade Membranproteine sind kristallographischen Untersuchungen schwerer zugänglich, da sie im Vergleich zu

wasserlöslichen Proteinen schlechter kristallisierbar sind. Neben dem Natrium/Protonen Antiporter NaH [94-96] konnten auch Bakteriorhodopsinmoleküle zurückgefaltet werden [97]. Das Bakteriorhodopsin wurde dabei teilweise entfaltet und wieder in die Purpurmembran zurückgefaltet.

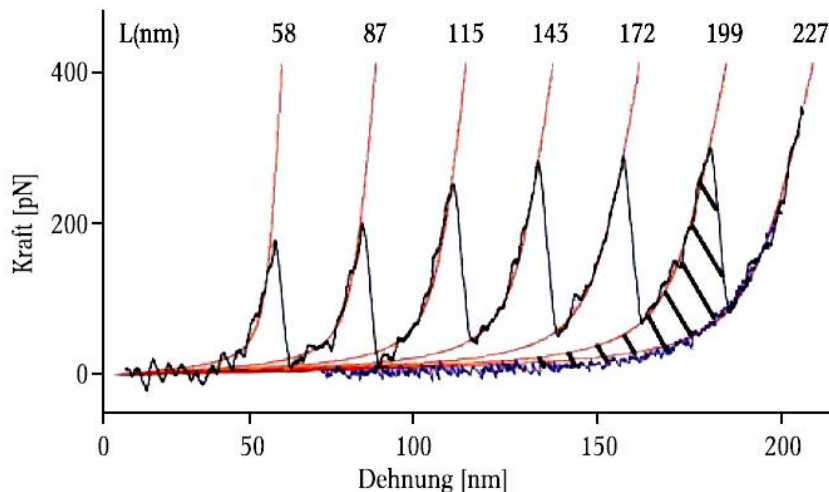


Abb. 2.1: Kraft-Abstandscurve der Entfaltung des Muskelproteins Titin [aus 98]. Die Peaks ergeben sich aus der Entfaltung der einzelnen Domänen.

2.5.2.1 Prinzip der Kraftspektroskopie

Das zu untersuchende Objekt muss auf einer festen Oberfläche adsorbiert werden. Dies kann durch eine spezifische Ankopplung geschehen wie z.B. eine kovalente Cystein-Gold-Bindung oder unspezifisch durch elektrostatische oder Van-der-Waals Wechselwirkungen. Nähert man nun die AFM Spitze an das Substrat an und drückt sie mit einer bestimmten Kraft auf die Probe, beobachtet man bei einem Teil der Versuche eine unspezifische Ankopplung des Untersuchungsobjekts an die Spitze. Beim Zurückziehen der Spitze wird eine Kraft-Abstands Kurve (kurz Kraftkurve) aufgezeichnet. Dieser Vorgang wird in Abbildung 2.2 schematisch gezeigt: Die Spitze wird heruntergefahren (1) und mit einer bestimmten Kraft eine kurze Zeit auf das Untersuchungsobjekt gedrückt (2). Kommt es zur Ankopplung, vergrößert sich beim Zurückziehen die Durchbiegung der Spitze, die über ihre Kraftkonstante in eine Kraft umgerechnet werden kann (3). Erreicht man eine maximale Kraft (4), reißt das Objekt von der Spitze oder vom Substrat ab; die Kraft sinkt nun wieder plötzlich auf null ab (5).

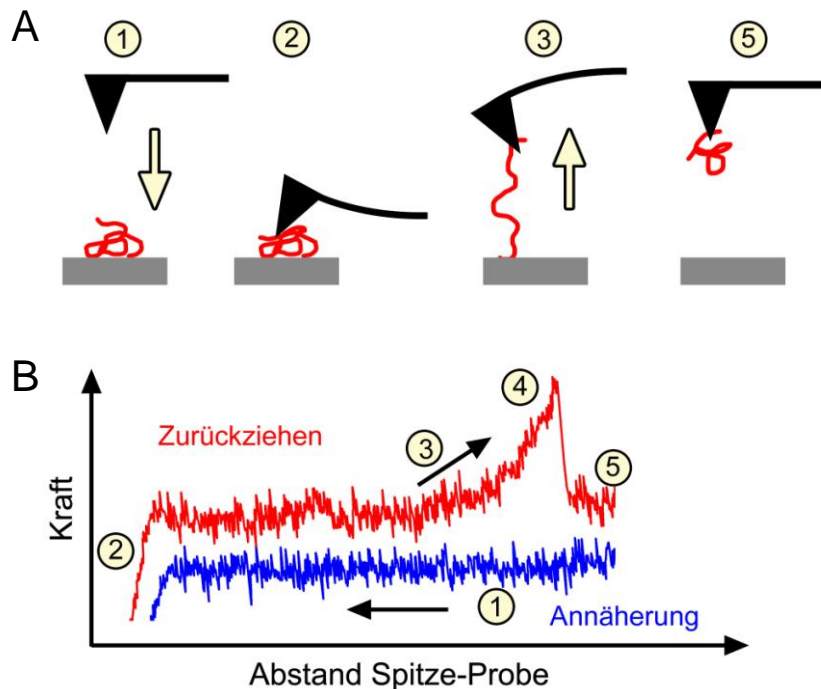


Abb. 2.2: Allgemeines Schema der Kraftspektroskopie. **A)** Die AFM-Spitze wird auf das zu untersuchende Objekt gedrückt (2) und zurückgezogen (3). Nachdem das Objekt von der Spitze oder der Oberfläche abgerissen ist schwingt die Spitze wieder frei (5). **B)** Die aus A resultierende Kraftkurve [nach 99].

2.5.2.2 Kraft-Abstands-Kurven

Beim Annähern und Zurückziehen der Spitze zeichnet die Software des AFM die Durchbiegung des Cantilevers in Abhängigkeit von der Z-Position auf. Die Durchbiegung wird als Volt-Signal ausgegeben, das über die Durchbiegungsempfindlichkeit (*deflection sensitivity*) in die Biegung des Cantilevers in Nanometer umgerechnet wird. Die Durchbiegungsempfindlichkeit hängt von der Position des Laserstrahls auf der Spitze und der Verkipfung der Spitze im Cantileverhalter ab. Sie muss deshalb nach jeder Laserneuejustierung und jedem Austausch der Spitze neu bestimmt werden. Dies geschieht, indem man die Spitze auf einen nichtelastischen Untergrund drückt. Aus der Steigung der Kraftkurve berechnet die Software die Durchbiegungsempfindlichkeit.

Um aus der Biegung des Cantilevers die Kraft zu berechnen, benötigt man die Kraftkonstante des Cantilevers. Diese kann aus der Geometrie des Cantilevers berechnet werden [100]. Da die genauen Abmessungen der Spitze meist nicht bekannt sind ist diese Methode ungenau. Das technisch anspruchsvolle Anbringen von definierten

Gewichten an die Spitze liefert bessere Ergebnisse [101]. Eine elegantere Methode ist das Ermitteln der Kraftkonstante über das thermische Rauschen [102]. Diese Methode wurde zum kalibrieren der Kraftkonstanten für diese Arbeit eingesetzt. Dabei wird das thermische Rauschen der frei schwebenden Spitze über einen bestimmten Zeitraum aufgezeichnet und die Kraftkonstante über die quadratisch gemittelte Auslenkung des Cantilevers berechnet.

Die Z-Position spiegelt nicht den wirklichen Abstand zwischen Spitze und Probe wider, da der Cantilever während der Messung unterschiedlich stark gebogen ist. Um eine echte Kraft-Abstands-Kurve zu erhalten muss die Durchbiegung des Cantilevers in jedem Punkt vom Z-Wert abgezogen werden.

2.5.2.3 Fitten der Kraftkurven

Die Ereignisse einer Kraft-Abstands-Kurve bilden die Entfaltung und Streckung von Molekülen ab. Wird ein Untersuchungsobjekts z.B. ein Protein gestreckt, steigt die aufgezeichnete Kraft solange an, bis sich das Protein von der Oberfläche oder der Spitze löst. Besteht das Protein aus mehreren Struktureinheiten können diese unabhängig voneinander entfaltet und gestreckt werden (siehe Abb. 2.1: Titin wird domänenweise entfaltet). Eine plötzliche Entfaltung führt zu einem Absinken der Kraft auf null, während bei einer Streckung des entfalteten Moleküls ein Anstieg der Kraft zu beobachten ist. Der Zeitpunkt, an dem sich ein bestimmtes Strukturmerkmal entfaltet, kann jedoch von Molekül zu Molekül variieren. Nicht das Maximum eines Peaks ist ausschlaggebend um die Position eines Strukturmerkmals im Protein zu lokalisieren, sondern der Verlauf der Kurve. Aus diesem Grund ist es nötig ein theoretisches Modell, das die Dehnung eines entfalteten Proteins beschreibt, an die Messdaten anzupassen. Zur Beschreibung der Dehnung von Proteinen und DNA-Strängen eignet sich das WLC-Modell (*Worm Like Chain*, Gleichung 2.1), das zum Anfitten der Kraftkurven dieser Arbeit verwendet wurde.

$$F(x) = \frac{k_B T}{l_p} \left[\frac{1}{4} \left(1 - \frac{x}{L} \right)^{-2} + \frac{x}{L} - \frac{1}{4} \right] \quad (\text{Gl. 2.1})$$

$F(x)$ ist die Zugkraft, x die Ausdehnung des Polymers, l_p die Persistenzlänge und L die Konturlänge. Gleichung 2.1 ist eine Näherungsformel [103], welche die Streckung des

Proteinrückrades im Bereich weniger hundert Piconewton gut beschreibt. Als Persistenzlänge wurde ein Wert von 0,4 nm angenommen [92, 104]. Die Konturlänge ist der Fitparameter. Sie ist die Länge, bis zu der das Protein nach dem WLC-Modell maximal gedehnt werden kann und damit die Länge des an diesem Peak gestreckten Proteins.

2.5.2.4 Kraftspektroskopie an Purpurmembranen

Das membrangebundene Protein Bakteriorhodopsin ist das am besten kraftspektroskopisch untersuchte Protein [93, 97, 104]. Dies liegt vor allem daran, dass das Molekül in einem zweidimensionalen Kristall angeordnet ist. Das Protein ist im Kristallverbund vergleichsweise stabil und gut mit dem Rasterkraftmikroskop abbildbar. Hinzu kommt, dass das Protein nicht aufwendig spezifisch auf der Oberfläche fixiert werden muss, sondern die Purpurmembranen als Einheit auf einem Träger immobilisiert werden können. Führt man kraftspektroskopische Experimente in der Mitte einer vorher abgebildeten Membran aus, kann man mit großer Wahrscheinlichkeit Bindungsereignisse registrieren. Da die Membranen entweder mit der zytoplasmatischen oder mit der extrazellulären Seite zur Spitze gewandt sind, ist nicht das ganze Molekül für die Spitze zugänglich sondern nur die interhelikalen Loops oder die Termini des Proteins. Greift die Spitze an einem Loop an, wird das BR-Monomer gleichzeitig in Richtung beider Termini aus der Purpurmembran gezogen. Diese Kurven sind nicht auswertbar und wurden aus diesem Grund nicht berücksichtigt. Heftet sich einer der Termini an die AFM-Spitze, kann die Entfaltung nur in Richtung des entgegengesetzten Terminus erfolgen; die Entfaltungsereignisse können nun im BR-Molekül lokalisiert werden. Die terminalen Kurven lassen sich über ihre Gesamtlänge von den Kurven unterscheiden, die durch eine Entfaltung von einem der Loops aus entstanden. Nur Kurven die eine Gesamtlänge von mehr als 50 nm aufweisen wurden vom C- oder N-Terminus entfaltet [63, 104].

Entfaltet man membrangebundenes Bakteriorhodopsin von einem der Termini aus, erhält man Kraftkurven mit vier charakteristischen Maxima. Zu diesen Hauptpeaks kommen häufig Nebenpeaks, die nicht in jeder Kraftkurve auftreten. Die Hauptpeaks lassen sich durch das paarweise Herausziehen und Entfalten der Helices aus der Membran erklären. Greift die Spitze am C-Terminus an, wird erst der Terminus

gestreckt (Peak 1), dann werden die Helices F und G aus der Membran gezogen und entfaltet (Peak 2), dann die Helices D und E (Peak 3) und im letzten Schritt die Helices B und C (Peak 4). Löst sich Helix A aus der Membran oder reißt das Protein von der AFM-Spitze ab, sinkt die Kraft wieder auf null (Abb. 2.3). Oesterhelt et al. zeigten mit AFM-Aufnahmen vor und nach Kraftspektroskopischen Experimenten, dass das BR-Monomer in den meisten Fällen aus der Membran entfernt wird [93].

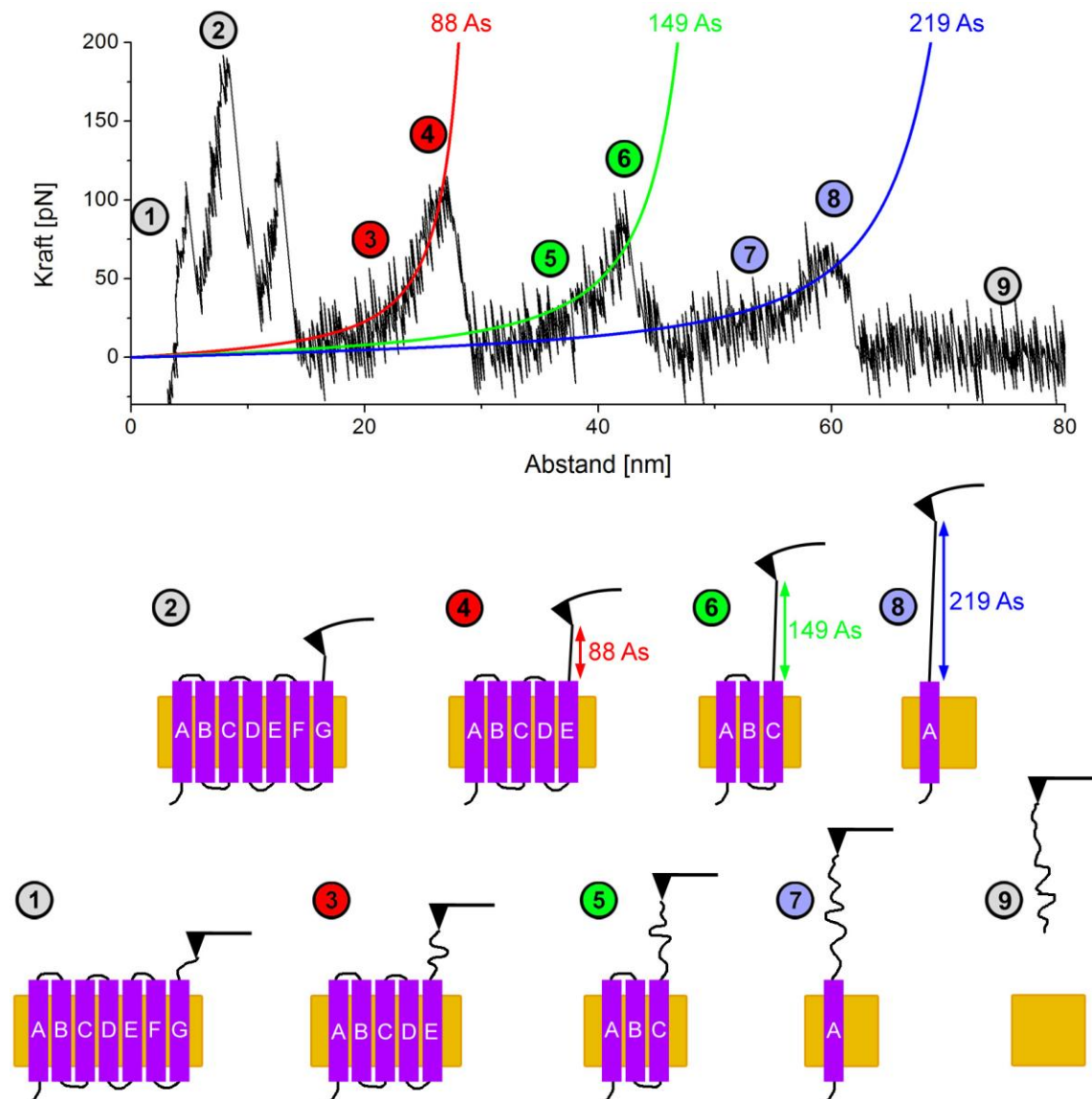


Abb. 2.3: Kraftspektroskopie an BR von der zytoplasmatischen Seite. Der obere Bildteil zeigt eine typische Kraftkurve von Wildtyp-BR auf Glimmer. Unten ist die Entfaltung schematisch dargestellt: Die paarweise Entfaltung der transmembranen α -Helices führt zu dem charakteristischen 4-Peak-Muster.

Liegt die PM mit der extrazellulären Seite zur AFM-Spitze gewandt, wird das Protein am N-Terminus aus der Membran gezogen. Auch hier wird eine paarweise Entfaltung der Helices beobachtet, die in vier Hauptpeaks und von Monomer zu Monomer unterschiedlichen individuellen Nebenpeaks resultiert [63]. Wird BR von der extrazellulären Seite aus der Membran gezogen, wird zuerst der N-Terminus gestreckt und dann die Helices A und B entfaltet und gestreckt, der dritte Peak entspricht dem Entfalten und Strecken der Helices C und D, die Entfaltung und Streckung der Helices E und F resultieren im vierten Peak. Durch die unterschiedliche Länge der Helices sind die Abstände der extrazellulären Peaks von denen der zytoplasmatischen Seite verschieden (Tab. 2.1). Werden mehrere Kraftkurven von einer Purpurmembran aufgenommen, überlagert und die Differenz zwischen den mit dem WLC-Modell gefitteten Peaks gebildet, kann die zytoplasmatische und die extrazelluläre Seite der PM an ihren charakteristischen Kraftkurven unterscheiden werden.

	Peak 2	Peak 3	Peak 4	$\Delta_{\text{Peak 3-2}}$	$\Delta_{\text{Peak 4-3}}$
BR-WT zytoplasmatisch	88 As	149 As	215 As	61 As	66 As
BR-WT extrazellulär [63]	74 As	133 As	223 As	59 As	90 As

Tab. 2.1: Positionen und Abstände der zytoplasmatischen und der extrazellulären Hauptpeaks von Wildtyp-BR auf Glimmer.

Da nicht bekannt ist, an welcher Aminosäure des C- oder N-Terminus die AFM-Spitze gebunden wird, werden die Kraftkurven so auf der x-Achse verschoben, dass der zweite Hauptpeak übereinstimmt. Der zweite Hauptpeak der zytoplasmatischen Kurven wird auf 88 Aminosäuren (As) oder 31,7 nm gelegt, diese Konturlänge entspricht einer Entfaltung des gesamten C-Terminus und der Helices F und G. Die Kraftkurven werden so normiert, als hätte die Spitze bei jeder Kurve an die letzte Aminosäure des C-Terminus gebunden.

2.5.2.5 Kraftspektroskopie aus dem *tapping mode*

Der *tapping mode* ist dem *contact mode* vorzuziehen, wenn weiche Proben abgebildet werden sollen, ohne diese durch die während der Messung wirkenden Kräfte zu beeinflussen oder zu zerstören. Um direkt aus diesem schonenden Messmodus Kraftspektroskopie betreiben zu können muss die Anregungsamplitude der Spitze herabgesetzt werden. Ein Vergleich des Rauschens der Kraftkurven aus dem *tapping mode* bei kleiner und großer Anregungsamplitude wird in Abbildung 2.4 gezeigt; das Rauschen kann so auf ein dem *contact mode* ähnliches Niveau gesenkt werden. Die Kraftkurven, die mit dieser Methode an BR gemessen wurden unterscheiden sich nicht von denen, die aus dem *contact mode* heraus gemessen wurden (Abb. 2.5).

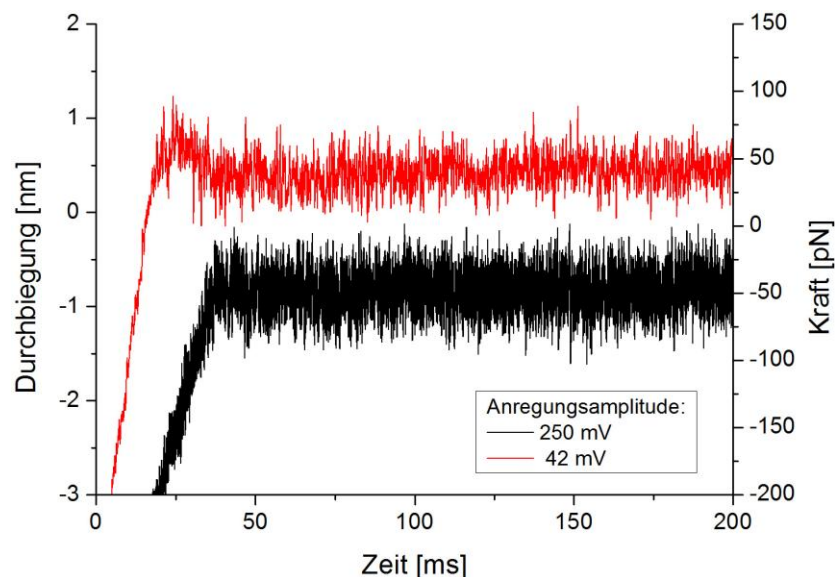


Abb. 2.4: Vergleich des Rauschens von Kraftkurven aus dem *tapping mode* bei großer und kleiner Anregungsamplitude. Die rote Kurve zeigt eine Kraftkurve, die mit einer Anregungsamplitude von 42 mV aufgenommen wurde. Die schwarze Kurve wurde bei 250 mV aufgenommen. Das Rauschen wurde durch die Herabsetzung der Anregungsamplitude deutlich verringert.

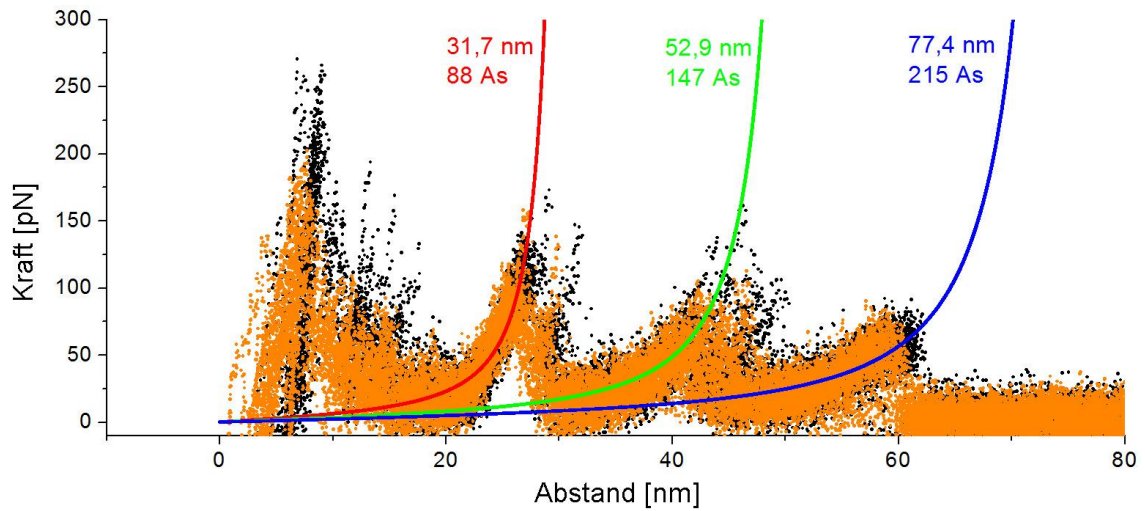


Abb. 2.5: Vergleich von zytoplasmatischen Kraftkurven auf Wildtyp-PM. Die aus dem *tapping mode* mit kleiner Anregungsamplitude gemessenen Kraftkurven (orange Punkte, $n = 22$) unterscheiden sich nicht von denen aus dem *contact mode* (schwarze Punkte, $n = 28$).

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 pH-induzierte PM-Krümmung

D. Porschke untersuchte die Biegung von belichteten D96N-PM-Suspensionen durch elektrooptische Methoden [39]. Die ersten Analysen durch bildgebende Verfahren wurden mittels Elektronenmikroskopie von Rhinow und Hampp durchgeführt [40]. Um die Krümmung von Purpurmembranen unter möglichst physiologischen Bedingungen zu untersuchen, wurden die BR-Mutanten D85T und D85N verwendet und mittels Rasterkraftmikroskopie in wässriger Umgebung analysiert. Durch Einzelmolekül Kraftspektroskopie aus dem *tapping mode* war es möglich die Bieungsrichtung der Purpurmembranen zu bestimmen.

Wird BR mit Licht bestrahlt, isomerisiert das Retinal von der all-trans in die 13-cis,15-anti-Konformation. Die Energieaufnahme führt über mehrere Intermediate (siehe Kap. 1.1) zur Deprotonierung der Schiff'schen Base im M^I -Zustand. Während des irreversiblen Übergangs in den M^{II} -Zustand ändert sich die Konformation des Proteins (Abb. 3.1) [5, 22, 105, 106]: Der zytoplasmatische Halbkanal des BR öffnet sich, so dass in den folgenden Schritten die Schiff'sche Base reprotoniert und die Asparaginsäure 96 von der zytoplasmatischen Seite reprotoniert werden kann. Durch eine Neigung von Helix F erhält das BR-Monomer eine Keilform. Dies führt zu einer Krümmung der gesamten Membran, da die BR-Trimere im hexagonalen 2D-Kristall der PM stark aneinander gekoppelt sind.

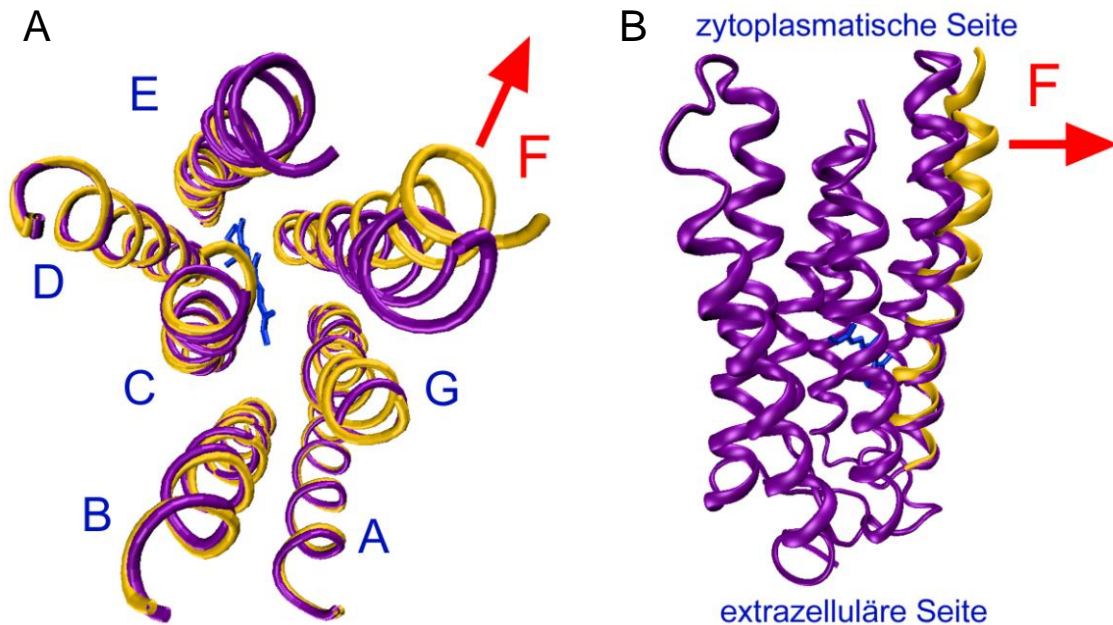


Abb. 3.1: Vergleich der Tertiärstrukturen von BR im B-Zustand (purpur) und im M-Zustand (gelb) (nach PDB-Einträgen 1FBB und 1FBK [5], die Strukturen wurden mit dem PC-Programm VMD erstellt [107]). Die Neigung der Helix F (roter Pfeil) resultiert in einer Keilform des Monomers. Das Chromophor Retinal in der Mitte der Pore ist blau dargestellt. **A)** Ansicht von der zytoplasmatischen Seite. **B)** Ansicht aus der Membranebene.

Bei Untersuchungen von belichteten Wildtyp-Purpormembranen konnte keine Biegung festgestellt werden [40, 108]. Die Biegung wurde nur in BR-Mutanten beobachtet, die den keilförmigen M^{II} -Zustand akkumulieren. Die BR-Mutante D96N zeichnet sich durch eine stark verlängerte Lebensdauer des M^{II} -Zustandes aus, der Photozyklus wird jedoch immer noch durchlaufen. Daher sind nicht alle BR-Monomere einer PM in demselben Zustand und weisen eine unterschiedliche Form auf. Eine unregelmäßige Verformung der Membranen, wie sie in elektronenmikroskopischen Aufnahmen abgebildet wurden, ist die Folge [40].

BR-D85X-Mutanten (x = neutrale Aminosäure) weisen einen stark reduzierten pK_A -Wert (8-9) im Vergleich zu nicht belichtetem Wildtyp-BR (>13) auf [25, 26]. Daher lässt sich der Protonierungsgrad der Schiff'schen Base dieser Mutanten über den pH-Wert des Mediums einstellen. In alkalischem pH ist die Schiff'sche Base wie im M-Intermediat des BR-Photozyklus deprotoniert. Abhängig vom pH-Wert liegen BR-D85N und BR-D85T in drei spektroskopisch unterscheidbaren Zuständen vor, die als analog zu Photointermediaten des Wildtyp-BR angesehen werden können [109, 110]:

- Blauer Zustand: überwiegt bei $\text{pH} < 8$, entspricht O-Intermediat
- Purpur Zustand: kleine Population, entspricht N-Intermediat
- Gelber Zustand: überwiegt bei $\text{pH} > 9$, entspricht M^{II} -Intermediat

Es ist also möglich in alkalischem pH die Mehrzahl der BR-D85X-Proteine in den M^{II} -analogen Zustand zu überführen. Kristallstrukturen der Mutante D85N bei alkalischen pH-Werten zeigten eine Öffnung des zytoplasmatischen Halbkanals, wie sie im M^{II} -Zustand des Wildtyps beobachtet wird [110, 111]. Auch Festkörper NMR-Messungen an BR-D85N bestätigen diese Ergebnisse [112].

Mit dem AFM in alkalischem Puffer konnte die PM-Biegung an den D85X-Mutanten BR-D85N und BR-D85T im thermischen Gleichgewicht analysiert werden (Abb. 3.2). Die Abbildungen zeigen, dass alle Membranen unter diesen Bedingungen gekrümmt sind. Die Höhe der Membranen beträgt maximal mehrere 100 nm.

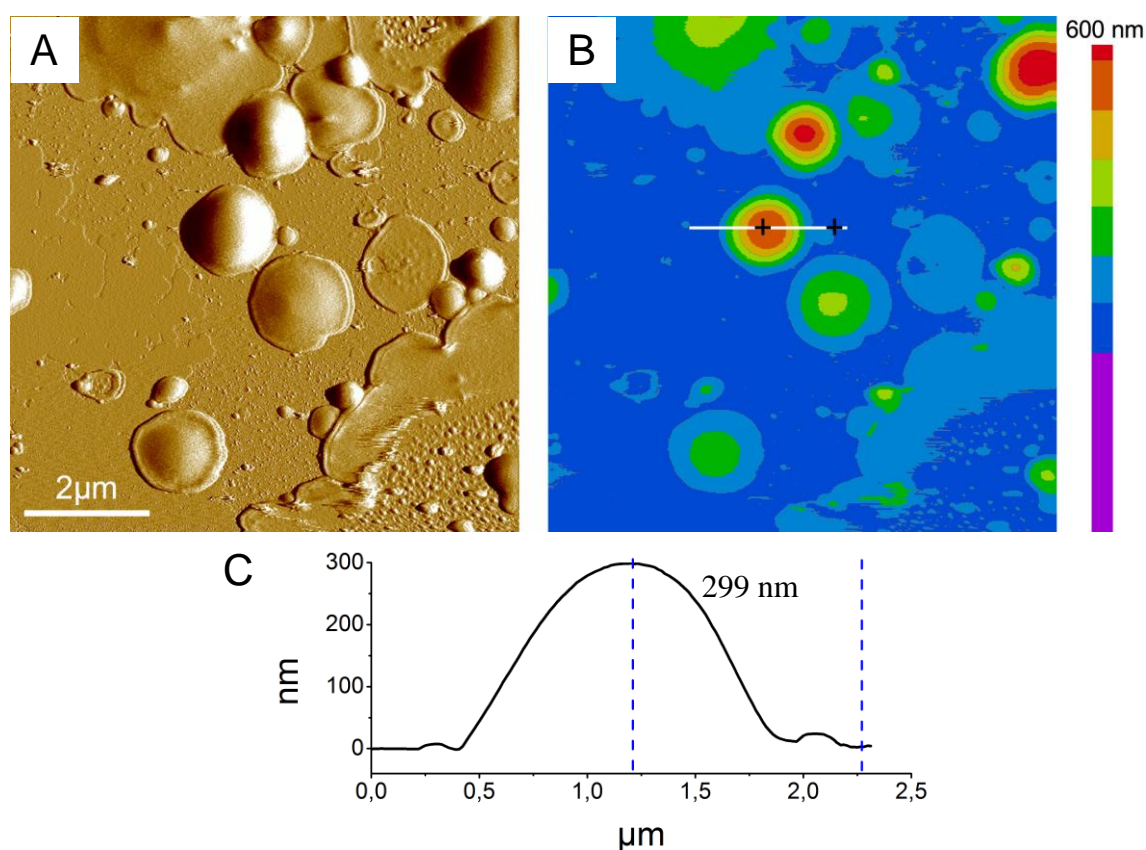


Abb. 3.2: *Tapping mode* AFM-Aufnahme von gebogenen BR-D85N in alkalischem pH. **A)** Amplitudenbild, **B)** Topographie, **C)** Querschnitt durch eine gekrümmte PM (in B markiert).

Gekrümmte PMs können entweder mit ihrer konvexen oder ihrer konkaven Seite auf Glimmer adsorbieren. Übersichtsaufnahmen wie Abbildung 3.2 deuten darauf hin, dass

die Verteilung der Membranseiten nicht gleichmäßig ist; die Mehrheit der Membranen erscheint konvex. Abbildung 3.3 zeigt eine schematische Darstellung der Biegung und Adsorption von D85X-PM auf Glimmer. In alkalischem Puffer suspendiert, krümmen sich die Purpurmembranen (Abb. 3.3A). Während der Adsorption nähern sich die Membranen an die Oberfläche an und gehen attraktive Wechselwirkungen mit dem Substrat ein, die der Biegung entgegenwirken (Abb. 3.3B). Konvex gebogene Membranen werden an ihrem Rand stark beeinflusst, während sie in ihrem Zentrum keinen Kontakt zur Oberfläche haben, daher ist häufig ein weniger stark gebogener Rand der Membranen zu beobachten (Abb. 3.4 rechte Membran bzw. Profil 2). Konkave Membranen werden von ihrer Mitte aus stark von der Oberfläche beeinflusst. Man beobachtet einen flachen inneren Membranbereich und einen gebogenen Rand (Abb. 3.4 linke Membran bzw. Profil 1). Die Ergebnisse zeigen, dass die Membranbiegungskraft größer ist als die Oberflächenwechselwirkung zwischen Glimmer und PM.

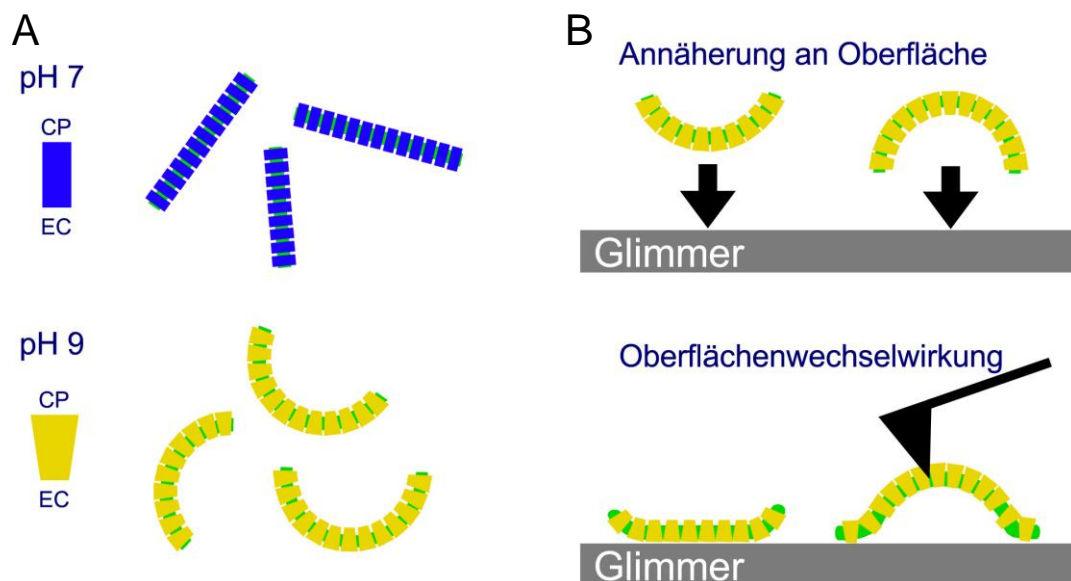


Abb. 3.3: Schema der Adsorption von D85X-PM in alkalischem Puffer auf Glimmer. **A)** Die BR-Monomere nehmen bei pH 9 eine „keilförmige“ Struktur an, die zur Krümmung der Membranen führt. **B)** Bei der Annäherung an die Oberfläche wirken attraktive Kräfte. Konkave Membranen werden im Zentrum verformt, während konvexe Membranen einen flachen Rand besitzen.

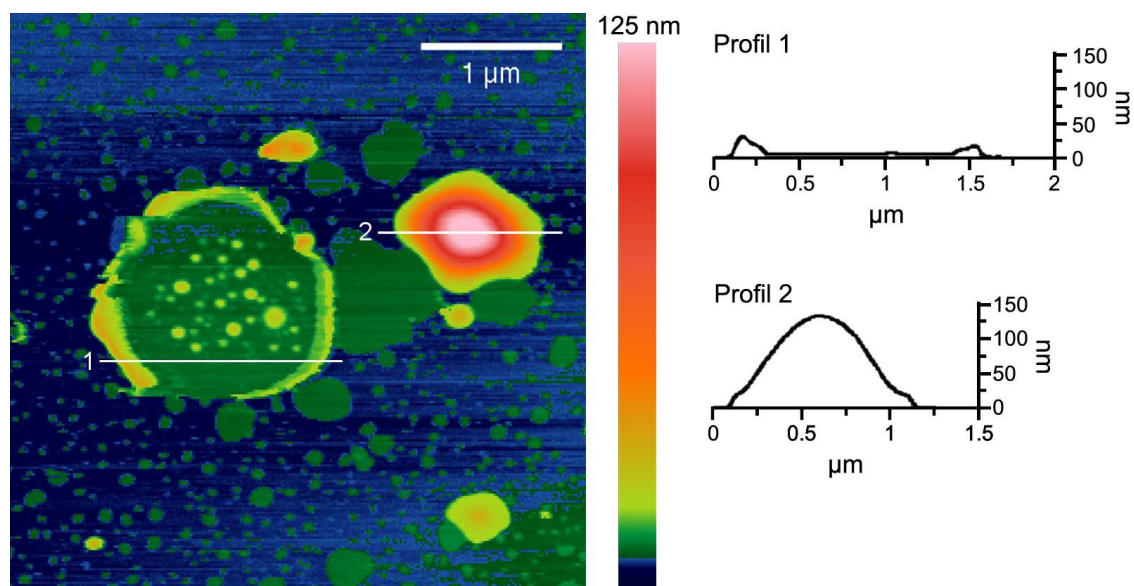


Abb. 3.4: Das AFM-Bild zeigt eine konkave Membran (links) und eine konvexe Membran (rechts). Die Höhenprofile sind durch nummerierte Striche markiert.

Die Biegungsrichtung der PM konnte in vorangegangenen Untersuchungen an gekrümmten Membranen nicht bestimmt werden. Versuche molekulare Auflösung zur Unterscheidung der extrazellulären und der zytoplasmatischen Seite der PM auf gebogenen Membranen zu erreichen waren nicht erfolgreich. Die große Flexibilität und starke Biegung der konvexen Purpurmbranen führt zu einer drastischen Reduzierung der erreichbaren Auflösung. Aus diesem Grund wurde Einzelmolekül Kraftspektroskopie zur Identifizierung der Biegungsrichtung genutzt. Kraftkurven, die an der zytoplasmatischen Seite der PM aufgenommen wurden, unterscheiden sich von den an der extrazellulären Seite erhaltenen Kurven und können so zur Identifizierung der Seiten genutzt werden (siehe Kap. 2.4.2) [63]. Abbildung 3.5 zeigt die Kraftkurven, die an konvexen BR-D85N-Membranen (Abb. 3.5A, rote Punkte) und BR-D85T-Membranen (Abb. 3.5B, rote Punkte) aufgenommen wurden, im Vergleich zu Wildtyp-BR-Kraftkurven von der zytoplasmatischen Seite (graue Punkte). Die Hauptpeaks der BR-D85X-Mutanten haben die gleichen Abstände wie die Peaks der zytoplasmatischen Wildtyp-Kraftkurven (Tab. 3.1). Daraus kann geschlossen werden, dass die Kraftkurven der konvexen D85X-PM von der zytoplasmatischen Seite aufgenommen wurden. Dieses Ergebnis bestätigt das oben vorgestellte Modell der Biegung: Die D85X-Monomere öffnen in alkalischem pH ihren zytoplasmatischen Halbkanal. Aus der Verformung der Monomere resultiert eine Biegung der PM.

Die maximalen Kräfte der Peaks der beiden Mutanten scheinen sich, wie einige Nebenpeaks, von den Wildtyp-BR-Kurven zu unterscheiden. Ein Grund hierfür kann die Tatsache sein, dass die Kurven in der Mitte der konvexen Membranen aufgenommen wurden; an diesen Stellen besteht kein Kontakt zur Oberfläche. Die Wildtyp-BR-Kurven wurden auf flachen Membranen aufgenommen, die komplett auf einer Glimmeroberfläche adsorbiert waren und somit von Wechselwirkungen mit der Oberfläche beeinflusst sind. Auch die gegenüber dem Wildtyp veränderte Struktur der Monomere könnte zu einer Veränderung der intramolekularen Kräfte und der Entfaltungswege führen.

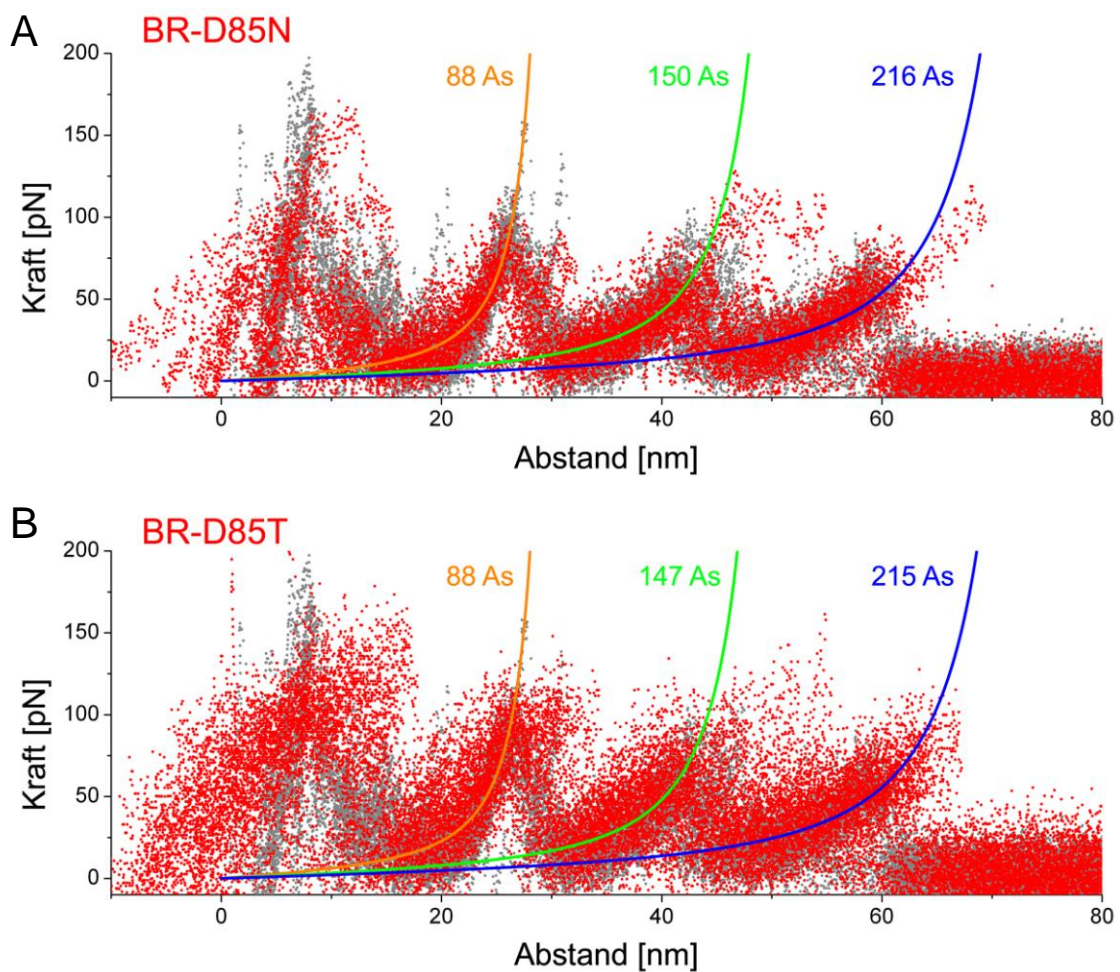


Abb. 3.5: Einzelmolekül Kraftspektroskopie aus dem *tapping mode* an BR-D85X-Mutanten (rote Punkte) im Vergleich zu Wildtyp-BR von der zytoplasmatischen Seite (graue Punkte, $n = 22$). **A)** Kraftkurven an konvexen BR-D85N-Membranen ($n = 14$). **B)** Kraftkurven an konvexen BR-D85T-Membranen ($n = 17$).

	Peak 2	Peak 3	Peak 4	Anzahl der Kurven	$\Delta_{\text{Peak 3-2}}$	$\Delta_{\text{Peak 4-3}}$
BR-WT zytoplasmatisch	88 As	149 As	215 As	22	61 As	66 As
BR-WT extrazellulär [63]	74 As	133 As	223 As	12	59 As	90 As
BR-D85N konvex	88 As	150 As	216 As	14	62 As	66 As
BR-D85T konvex	88 As	147 As	215 As	17	59 As	68 As

Tab. 3.1: Vergleich der Positionen und Abstände der Hauptpeaks von beiden Seiten der Wildtyp-PM und konvexen D85X-PM.

Aufgrund ihrer Biegung können die konvexen Membranen durch das Einwirken einer äußeren Kraft verformt werden. Abbildung 3.6 zeigt eine Membran, die vor und nach der Durchführung von kraftspektroskopischen Experimenten abgebildet wurde. Nach der Kraftspektroskopie ist eine Deformierung der Membran zu erkennen (Abb. 3.6B).

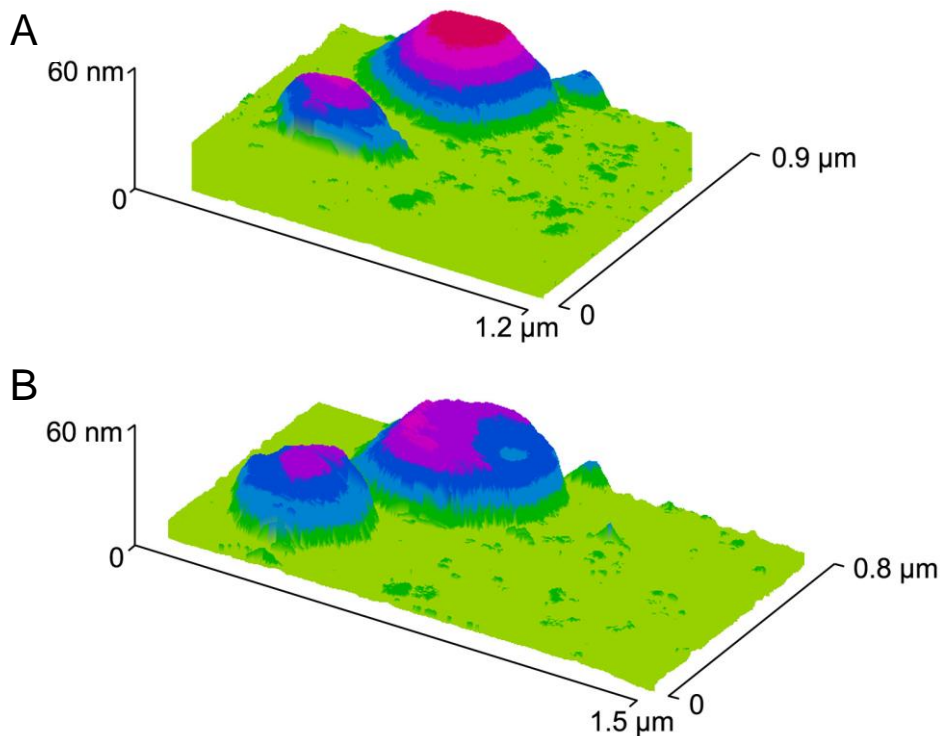


Abb. 3.6: AFM-Aufnahme einer konvexen D85N-Membran vor (A) und nach (B) der Kraftspektroskopie.

3.2 Orientierung von genetisch-modifizierter PM

Im folgenden Abschnitt wird die orientierte Immobilisierung von genetisch Modifizierten Purpurmembranen auf TSG-Substraten beschrieben. Weitere Methoden um orientierte PM-Lagen zu erhalten wurden in Kap. 1.4 vorgestellt.

3.2.1 Immobilisierung von Q3C-PM auf TSG-Substraten

Die Cystein-vermittelte Anbindung von Biomolekülen auf Goldoberflächen ist ein oft benutztes Verfahren [z.B. 113]. Wildtyp-BR enthält keine Cysteine. Durch genetische Modifikation kann jedoch ein Cystein in einem von außerhalb der Membran zugänglichen Bereich, wie einen Loop oder Terminus, eingebracht werden. Geschieht dies gezielt auf einer der beiden Membranseiten, kann die Orientierung der PM auf Goldoberflächen festgelegt werden.

Hier wurde die BR-Mutante Q3C benutzt, bei der im N-Terminus ein Glutamin gegen Cystein ausgetauscht wurde. Q3C-PM kann nur mit der extrazellulären Seite kovalente Gold-Schwefel-Bindungen mit dem TSG-Substrat eingehen. Durch die Bildung von tausenden von Bindungen wurden die Membranen irreversibel auf dem Substrat immobilisiert. Mit der zytoplasmatischen Seite adsorbierte Q3C-PMs konnten keine kovalente Bindung ausbilden und waren nur durch schwache unspezifische Wechselwirkungen gebunden. Diese Membranen wurden mit Waschschritten vom Substrat entfernt (Abb. 3.7).

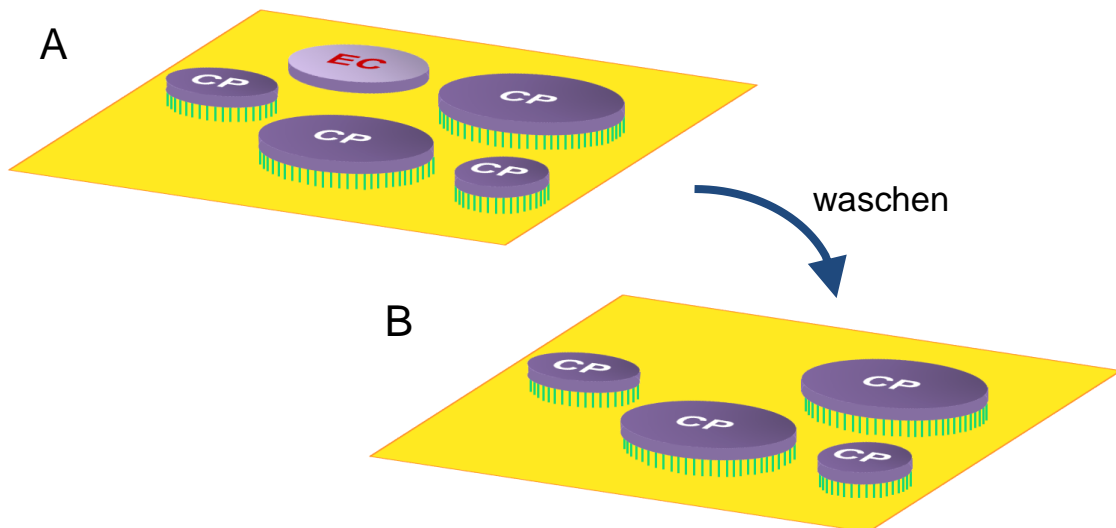


Abb. 3.7: Schema der Orientierung von Q3C-PM (purpur) auf einer Goldoberfläche (gelb). Die zum Puffer liegende Seite jeder Membran ist mit CP für zytoplasmatisch und EC für extrazellulär beschriftet. **A)** Q3C-PM wird auf einer Goldoberfläche adsorbiert. Die Membranen, die mit dem N-Terminus zur Goldoberfläche zeigen gehen eine kovalente Bindung ein (grüne Striche). **B)** Durch Waschen mit Puffer werden die entgegengesetzt orientierten Membranen abgelöst.

Abbildung 3.8 zeigt einige Q3C-Membranen auf einem TSG-Substrat. Auch wenn molekulare Auflösung auf den orientierten Membranen erreicht werden konnte (Abb. 3.8B) war die Auflösung nicht groß genug, um die Membranseiten eindeutig zu identifizieren.

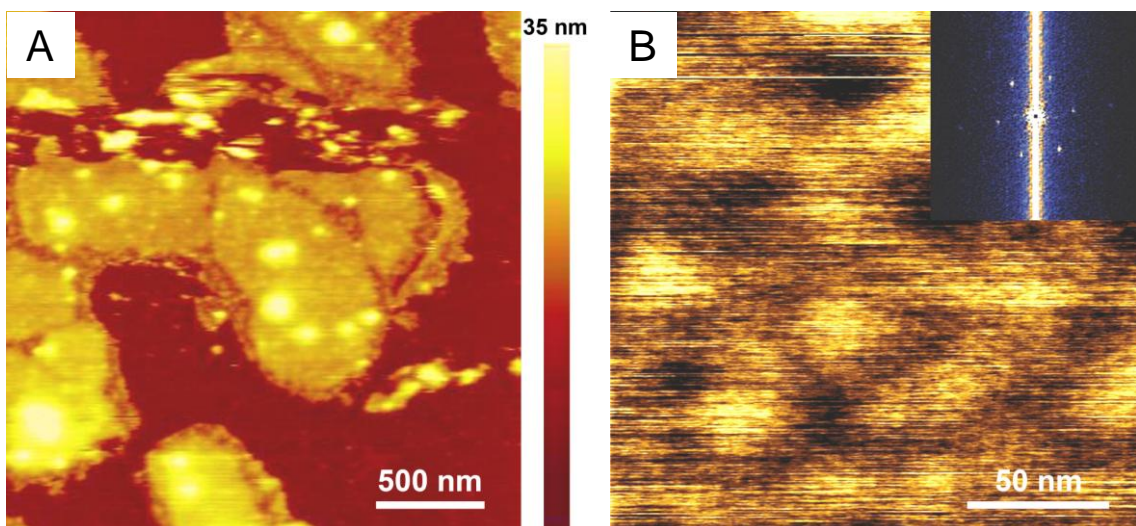


Abb. 3.8: AFM-Aufnahmen von Q3C-PM auf Gold. **A)** Übersichtsaufnahme. **B)** Aufnahme mit molekularer Auflösung; der Ausschnitt zeigt eine FFT-Transformation des Bildes.

3.2.2 Analyse der Bindung mit Einzelmolekül Kraftspektroskopie

Werden Q3C-Membranen mit der extrazellulären Membranseite auf der Goldoberfläche abgeschieden, gehen viele BR-Monomere eine Bindung ein. Einige Cysteine blieben jedoch ungebunden, da sie entweder noch mit Mercaptoethanol geschützt waren oder durch Luftsauerstoff oxidiert wurden. Ein weiterer Grund für die unvollständige Anbindung kann eine zu große Distanz zwischen den im Vergleich zu Glimmer rauen Goldoberflächen und Bereichen der PM sein, die durch ihren hexagonalen Kristall nicht beliebig flexibel ist.

Die Bindung der Q3C-PM auf dem Gold-Substrat wurde mit Einzelmolekül Kraftspektroskopie analysiert. Die Experimente zeigten drei unterschiedliche Typen von Kraftkurven. Die Kurven unterschieden sich in der Anzahl der Peaks und in der Abrisskraft des letzten Hauptpeaks (Abb. 3.9, Tab. 3.2). Abbildung 3.9A zeigt die Kraftkurven, die an ungebundenen BR-Q3C Molekülen erhalten wurden (Typ 1). Die 4 Hauptpeaks erscheinen an der gleichen Position wie bei Wildtyp-BR-Kurven auf Glimmer und Gold (Abb. 3.10).

Zwei Typen von Kraftkurven wurden an gebundenen Q3C-Monomeren erhalten (Abb. 3.9B und D). Diese Kurven zeigten einen neuen Peak mit einer größeren Konturlänge als die gewöhnlichen vier Hauptpeaks durch die neue Barriere am N-Terminus des Proteins. In Abbildung 3.9B erscheinen die ersten vier Hauptpeaks an den Positionen, wie sie an ungebundenem BR-Q3C oder Wildtyp-BR gemessen wurden. Nach dem vierten Peak sinkt die Kraft jedoch nicht auf null ab, sondern steigt nach kurzem Absinken wieder an (Typ 2). Dieser fünfte Peak besitzt eine Konturlänge von 83 nm oder 231 As und repräsentiert die Entfaltung von Helix A, die an Wildtyp-BR meist nicht beobachtet wird. Eine Vergrößerung dieser Region zeigt Abbildung 3.9C. Die Ergebnisse zeigen, dass die kovalente Anbindung der BR-Monomere zu einem zusätzlichen Peak mit einer höheren Abrisskraft führt. Ein weiterer Typ von Kraftkurven an gebundenen BR-Q3C-Monomeren wurde beobachtet (Abb. 3.9D, Typ 3): Diese Kurven besitzen nur den zusätzlichen Peak bei 231 As und keinen oder einen sehr kleinen Peak bei 217 As. Diesen Verlauf zeigte fast die Hälfte der an BR-Q3C gemessenen Kraftkurven. Das Fehlen des vierten Hauptpeaks kann mit der simultanen Extraktion der Helices A-C aus der Membran erklärt werden, während der zusätzliche Peak einer Bindung des Proteins an die Goldoberfläche entspricht. Die durchschnittliche

Kraft des zusätzlichen Peaks der beiden Typen ist höher als die Kraft des vierten Peaks von ungebundenem BR-Q3C (Tab. 3.2).

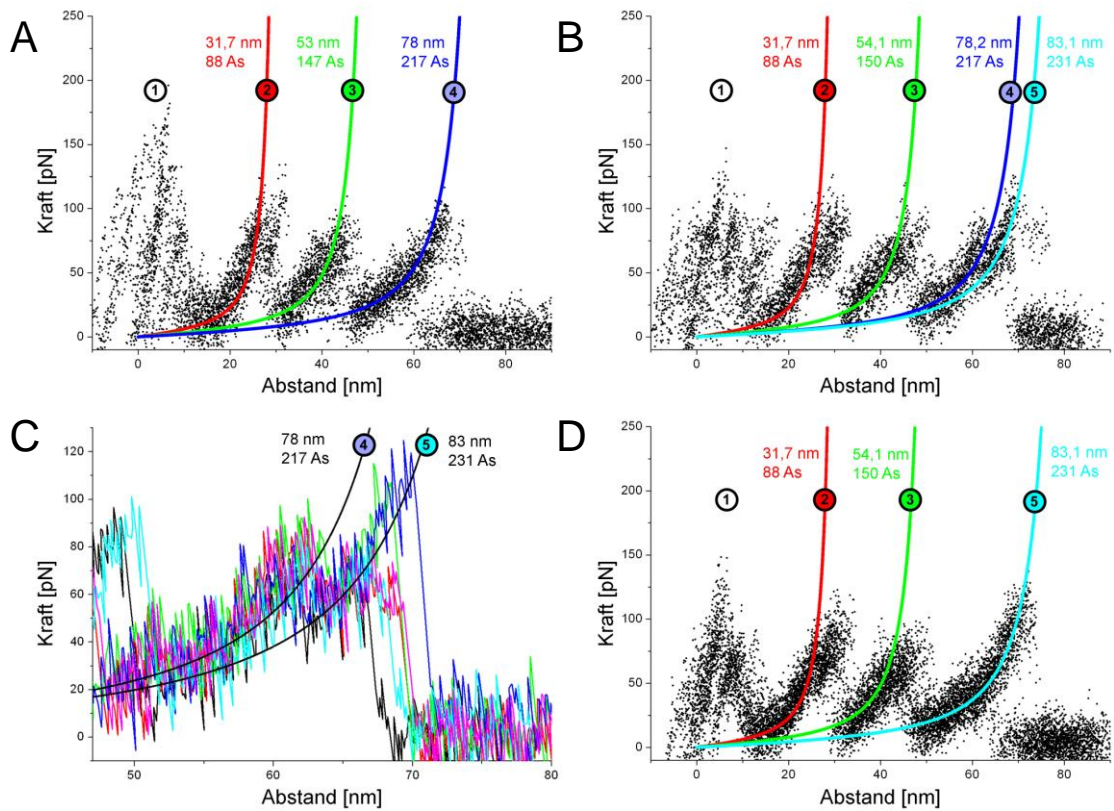


Abb. 3.9: Kraftkurven von BR-Q3C auf einem TSG-Substrat. **A)** Typ 1: Kurven mit vier Peaks (1-4); diese Kurven entsprechen ungebundenem Q3C-BR ($n = 10$). **B)** Typ 2: Kurven mit 5 Peaks: Die Peaks 1 bis 4 sind identisch mit denen in A, ein zusätzlicher Peak (5) wurde beobachtet ($n = 9$). **C)** Vergrößerung des vierten und fünften Peaks aus B. Die beiden Peaks können klar unterschieden werden. **D)** Typ 3: Kraftkurven, bei denen der vierte Peak fehlt, aber der zusätzliche Peak beobachtet wurde ($n = 15$). Die Kurven in B und D repräsentieren Q3C-BR, das kovalent an die Goldoberfläche gebunden ist.

Die zusätzliche Barriere durch die kovalente Bindung zwischen BR-Q3C und dem Goldsubstrat ist auf der extrazellulären Seite der Membran lokalisiert. Da der Nullpunkt der WLC-Fits auf der zytoplasmatischen Seite der PM liegt, ist die Konturlänge der gefitteten WLC-Kurven kleiner als das gedehnte Protein. Um die exakte Länge der Aminosäurenkette zu bestimmen, die bis zu dieser Barriere gedehnt wurde, muss der Abstand zwischen der zytoplasmatischen Oberfläche und der Barriere (ca. 4 nm = 11 As) zur Konturlänge des WLC-Fits addiert werden [104]. Da sich das eingeführte Cystein an Position 3 befindet, sollte der gedehnte Aminosäurestrang 245 As lang sein (248 As - 3 As). Bezieht man die Position der Barriere mit ein, sollte der WLC-Fit eine

Konturlänge von 234 As besitzen (245 As - 11 As). Die Länge der experimentell erhaltenen Fits entspricht 231 As.

	Peak Nr.	Kontur- länge [As]	As.- Position	Abriss- kraft [pN]	Anzahl der Kurven
Q3C auf Gold Typ 1 (Abb. 3.9 A)	2	88	160	100	10
	3	147	101	87	
	4	217	31	94	
Q3C auf Gold Typ 2 (Abb. 3.9 B)	2	88	160	95	9
	3	150	98	94	
	4	217	31	84	
	5	231	6	100	
Q3C auf Gold Typ 3 (Abb. 3.9 D)	2	88	160	85	15
	3	150	98	83	
	5	231	6	106	
WT auf Gold zyt. (Abb. 3.10 orange)	2	88	160	127	30
	3	146	102	90	
	4	214	34	80	
WT auf Glimmer zyt. (Abb. 3.10 schwarz)	2	88	160	126	28
	3	147	101	85	
	4	215	33	82	

Tab. 3.2: Zusammenfassung der Konturlängen und Kräfte der Kraftkurven von BR-Q3C auf Gold und zytoplasmatischer BR-WT-Kurven auf Gold und Glimmer.

Um sicherzustellen, dass die gemessenen Kräfte alleine von den Bindungskräften zwischen Cystein und Goldoberfläche resultieren, wurden Kraftkurven des Wildtyps von BR auf Gold und Glimmer aufgenommen (Abb. 3.10). Die Positionen der Hauptpeaks von Wildtyp-BR auf Gold sowie auf Glimmer waren in demselben Bereich wie vielfach für Wildtyp-BR auf Glimmer publiziert [63, 93, 104]. Es wurden keine Kraftkurven gefunden, die einen zusätzlichen Peak jenseits des vierten Hauptpeaks aufwiesen. Zudem waren die mittleren Abrisskräfte des fünften Peaks der Mutante BR-Q3C deutlich höher als die Kräfte des vierten Peaks des Wildtyps auf beiden Oberflächen (Tab. 3.2).

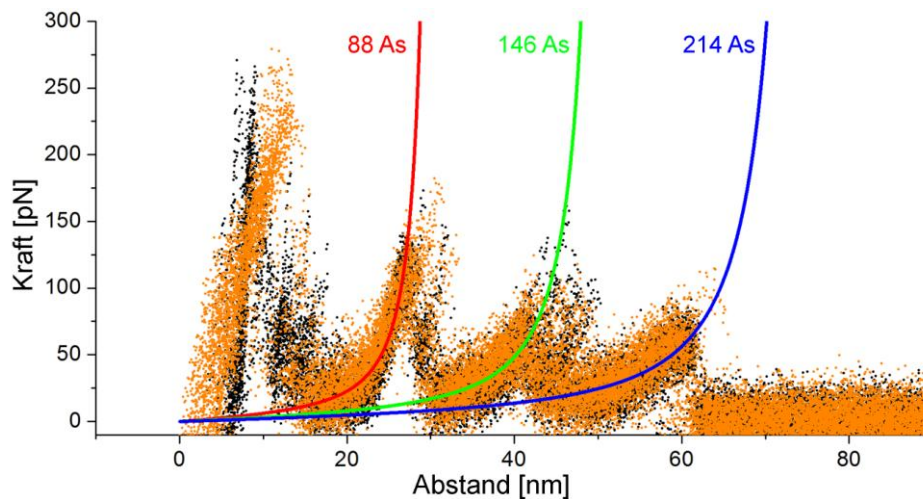


Abb. 3.10: Vergleich zwischen Kraftkurven, die an Wildtyp-PM auf Glimmer (schwarze Punkte, $n = 28$) und auf Gold (orange Punkte, $n = 30$) aufgenommen wurden.

In Abbildung 3.11 werden Kraftkurven von BR-WT und angebundenem BR-Q3C verglichen. Die Positionen der Barrieren sind in einem Schema der BR-Struktur markiert.

Neben den Kraftkurven, die vier Hauptpeaks enthalten, wurden an Wildtyp-BR und ungebundenem BR-Q3C auch Kurven gemessen, denen der vierte Peak fehlt. Diese drei-Peak Kurven deuten darauf hin, dass in manchen Fällen die Helices A bis C gleichzeitig entfaltet werden, während häufiger erst die Helices B & C und dann die Helix A entfaltet wird. Da der Abstand des zweiten und dritten Peaks in beiden Fällen der Gleiche ist, kann darauf geschlossen werden, dass auch diese verkürzten Kurven aus einer Entfaltung hervorgehen, bei der die AFM-Spitze am C-Terminus gebunden war. Wird eine Barriere, die dem vierten Peak in Abbildung 3.11 entspricht, beobachtet, resultiert aus der Cystein-Gold-Bindung ein fünfter Peak, der der Entfaltung von Helix A entspricht. Wenn der vierte Peak nicht messbar ist, wird für gebundenes Q3C-BR eine Kraftkurve erhalten, die den zusätzlichen Peak enthält aber nicht Peak vier (Typ 3, Abb. 3.9D). Der Grund für die Aufteilung in drei-Peak Kurven und vier-Peak Kurven ist nicht bekannt. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Entfernung eines Proteins aus dem BR-Trimer zu einer Destabilisierung der verbleibenden Monomere führt. Dies könnte zu einem veränderten Entfaltungsweg führen und somit zu zwei unterschiedlichen Typen von Kraftkurven.

Kessler et al. und Müller et al. beschrieben einen Nebenpeak mit einer Konturlänge von ca. 242 As (die Position der Barriere ist hier bereits addiert) für Wildtyp-BR auf

Glimmer. Während die Kräfte, die von Kessler et al. gemessen wurden gegenüber dem vierten Peak sanken [63], da zwischen der Glimmerunterlage und dem N-Terminus keine großen Kräfte wirken, zeigen Q3C-Kraftkurven auf Gold einen Anstieg der Abrisskraft des fünften Peaks (ca. 19%, siehe Tab. 3.2). Müller et al. fanden einen leichten Anstieg der Kraft [104]. Bei beiden Untersuchungen an Wildtyp-BR war die Anzahl der Kurven, die diesen Peak zeigten jedoch gering.

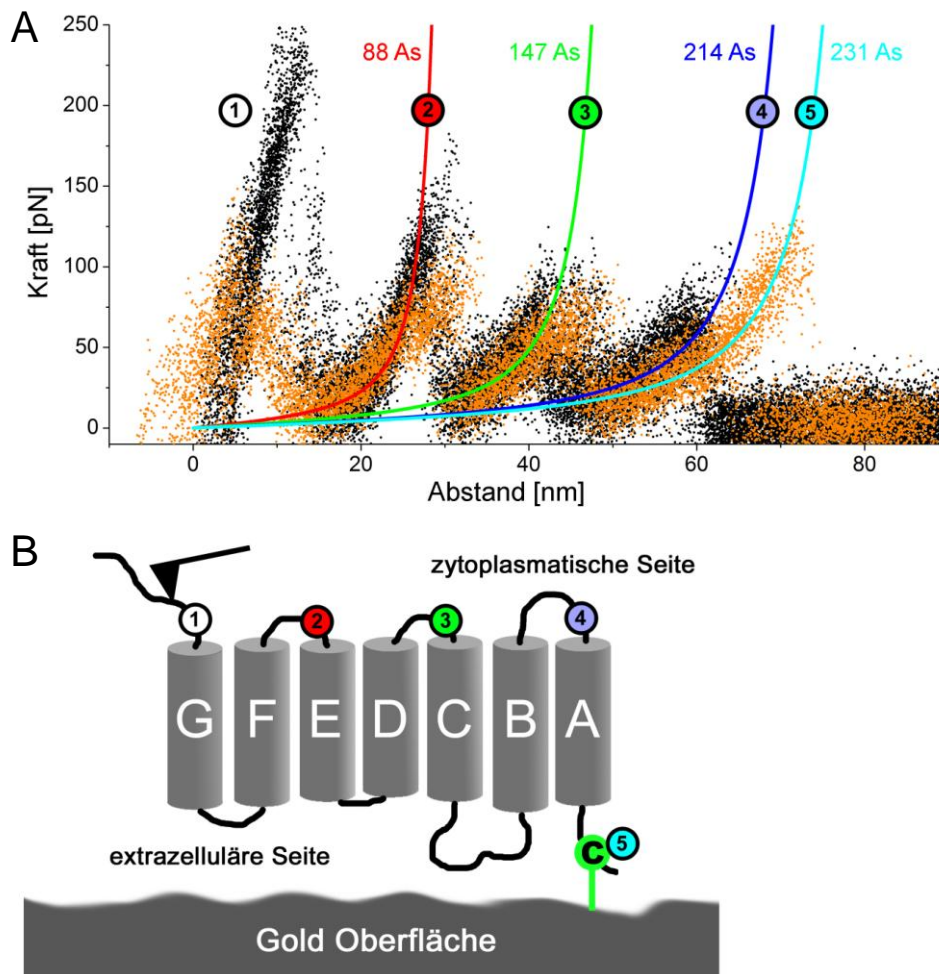


Abb. 3.11: **A)** Überlagerung von BR-WT Kraftkurven (schwarze Punkte, $n = 28$) und BR-Q3C Kurven, die einen zusätzlichen Peak bei einer Kontourlänge von 231 As zeigen (orange Punkte, $n = 15$). **B)** Die Positionen der Barrieren werden in einem Schema der Sekundärstruktur von BR markiert. Die Nummerierung der Barrieren und der Peaks in A und Abb. 3.9 entsprechen sich.

Aufgrund der geringen Datenmenge ist die hier durchgeführte Untersuchung nicht statistisch relevant. Von den verfügbaren Kraftkurven lässt sich eine Bindungsrate der Cysteinreste zur Goldoberfläche von ca. 50% ableiten, da dieser Anteil an Kurven einen zusätzlichen Peak mit einer Konturlänge im Bereich von 234 As zeigte.

Da die beiden Seiten der Q3C-PM nicht mit molekular aufgelösten AFM-Bildern unterschieden werden konnten (größte erreichbare Auflösung: Abb. 3.8B), wurden die Kraftkurven zur Identifizierung der Seiten verwendet [63]. In Tabelle 3.3 werden die Q3C-Kraftkurven ohne zusätzlichen Peak mit Wildtyp-Kurven von der zytoplasmatischen und der extrazellulären Seite der PM verglichen. Die Abstände der an BR-Q3C auf Gold erhaltenen Peaks entsprechen denen der zytoplasmatischen BR-WT-Kurven auf Gold und Glimmer. Daraus kann geschlossen werden, dass alle in dieser Untersuchung gemessenen Kraftkurven von der zytoplasmatischen Seite aus den Q3C-Membranen gezogen wurden. Die Orientierung von genetisch modifizierten Purpurmembranen unter Ausnutzung der hohen Affinität von Cystein zu Goldoberflächen kann also zur Erzeugung von orientierten PM-Monolagen genutzt werden.

	Peak 2	Peak 3	Peak 4	Anzahl der Kurven	$\Delta_{\text{Peak 3-2}}$	$\Delta_{\text{Peak 4-3}}$
Q3C auf Gold Typ 1 (Abb. 3.9A)	88 As	147 As	217 As	10	59 As	70 As
WT auf Gold zyt. (Abb. 3.10 orange)	88 As	146 As	214 As	30	58 As	68 As
WT auf Glimmer zyt. (Abb. 3.10 schwarz)	88 As	147 As	215 As	28	59 As	68 As
WT auf Glimmer extr. [63]	74 As	133 As	223 As	12	59 As	90 As

Tab. 3.3: Vergleich der Konturlängen von BR-Q3C auf Gold, BR-WT auf Gold von der zytoplasmatischen Seite und BR-WT auf Glimmer von beiden Membranseiten.

3.3 Fusion von PM

Die Fusion von Purpurmembranen unter Erhaltung ihrer natürlichen Eigenschaften wie ihrer außerordentlichen Stabilität gegenüber äußeren Einflüssen ist ein wichtiger Schritt zur technischen Anwendung dieses Biomaterials. Nicht-native Methoden und die Membranfusion *in vivo* wurden in Kapitel 1.5 skizziert. Das hier beschriebene Verfahren stellt einen neuen Ansatz dar, der auf der einer reversiblen Auflösung des hexagonalen 2D-Kristalls beruht.

Um zwei Purpurmembranen zu Verschmelzen, müssen die beiden Membranen zueinander ausgerichtet sein und mit ihren Kanten aneinander stoßen. Dies ist in Suspensionen sehr unwahrscheinlich; eine Vororientierung der Membranen auf einem Substrat ist also für die Membranfusion nötig.

3.3.1 Stabilität von PM auf Oberflächen

Eine Grundvoraussetzung für ein Interface zwischen Biomolekülen und einem festen Substrat, das technisch nutzbar sein soll, ist die Erhaltung der Funktion und Struktur des Proteins. Auch viele Analyseverfahren wie die Rastersondenmikroskopie oder SPR-Spektroskopie (*Surface Plasmon Resonance*) setzen eine Immobilisierung auf einer Oberfläche voraus – eine möglichst geringe Beeinflussung der Objekte ist für eine aussagekräftige Untersuchung wünschenswert.

Purpurmembranen eignen sich durch ihre große Stabilität, die durch die Anordnung der BR-Monomere in einem 2D-Kristall bedingt ist, als Untersuchungsobjekt für den Einfluss von Oberflächenwechselwirkungen auf Biomoleküle. Während bei allen AFM-Untersuchungen von PM von einer geringen Beeinflussung des Untersuchungsobjekts durch die Unterlage (meist Glimmer) ausgegangen wird, zeigen Untersuchungen, dass Oberflächenkräfte Strukturelemente von adsorbierten Proteinen beeinflussen können [114-117].

Werden Biomoleküle auf einer Oberfläche adsorbiert, treten komplexe Wechselwirkungen an den Grenzflächen auf. Die Stärke und Auswirkung dieser Kräfte wird vor allem von den Oberflächenladungen von Membran und Substrat, von der Stabilität des Proteins und von der Kontaktfläche mit der Oberfläche bestimmt. Im Falle

von Membranproteinen hängt die Stabilität der 3D-Struktur nicht nur von intramolekularen Kräften ab, sondern auch von Wechselwirkungen mit den Lipiden und den benachbarten Membranproteinen. Auch die Topographie des Substrats ist für großflächige Objekte wie Membranen wichtig, da auf rauen Oberflächen nur Teile der Membranen in Kontakt treten.

Die Stabilität von PM auf Oberflächen wurde an Glimmer untersucht, der sehr häufig für AFM-Analysen von PM als Substrat verwendet wird. Um einen Einfluss von Oberflächencharakteristika wie Ladung und Polarisierbarkeit auf die denaturierenden Eigenschaften des Substrats zu bestimmen wurden außerdem Purpurmembranen auf Gold- und Siliciumsubstraten und auf modifiziertem Glimmer analysiert.

3.3.1.1 Morphologie von PM auf Glimmer

Eine durch Oberflächen verursachte Denaturierung von PM wurde auf Glimmer beobachtet. Abbildung 3.12A und B zeigen eine PM direkt nach der Adsorption. Nach 100 min bei Raumtemperatur hat sich der flachere Rand um die Membran vergrößert (Abb. 3.12C und D). Querschnitte durch die Membran (Abb. 3.12B und D unten) zeigen, dass die Membran im Zentrum 5-6 nm hoch ist, während der Rand eine Höhe von ca. 4 nm aufweist. Um die große Membran herum befinden sich viele 4 nm hohe kleine Membranen, die ihre Form verändern und mit anderen Strukturen zu verschmelzen scheinen. Der niedrige Rand um die Membranen konnte nur mit *tapping mode*-AFM festgestellt werden und nicht mit dem oft für die Untersuchung von PM verwendeten *contact*-AFM.

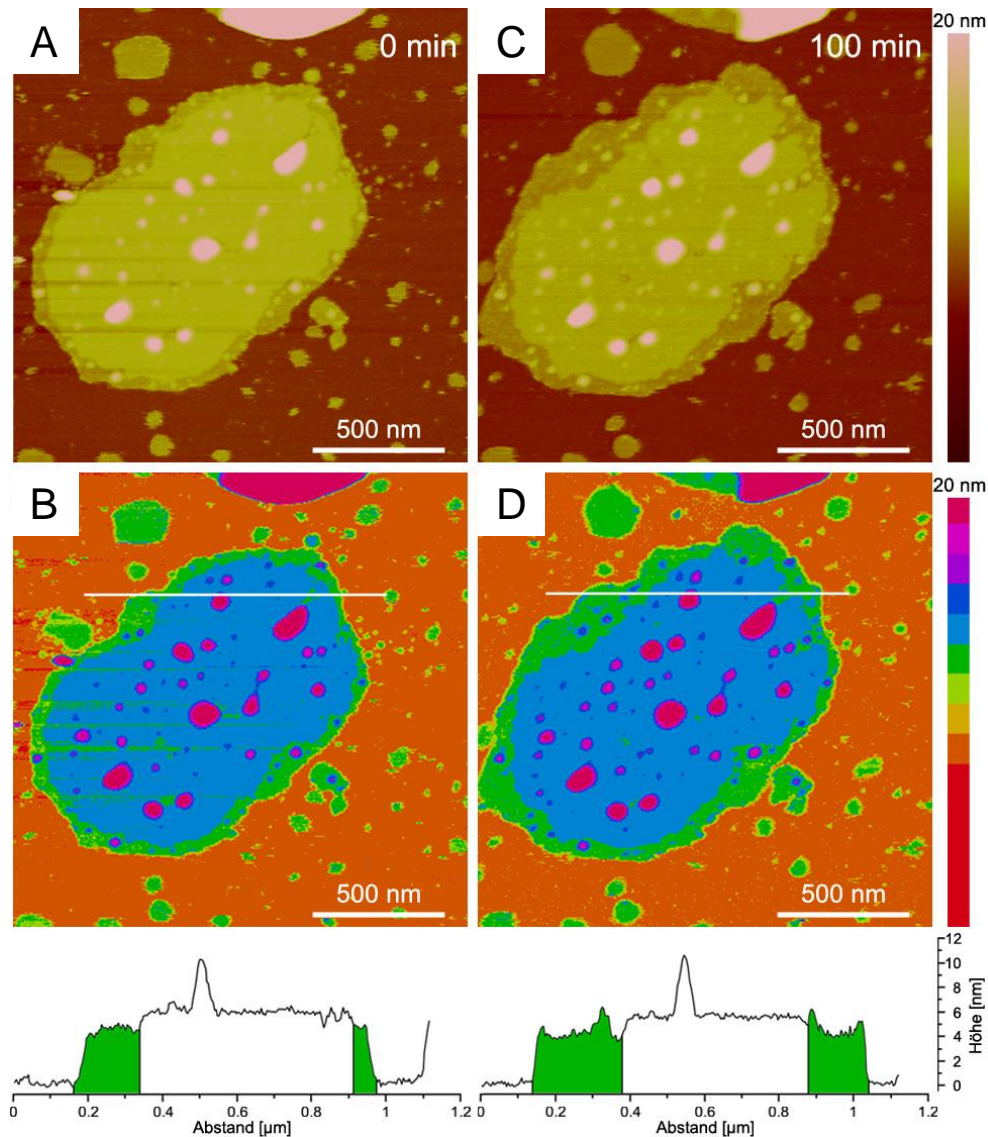


Abb. 3.12: Oberflächen-induzierte Denaturierung von Purpurmembranen auf Glimmer in Abhängigkeit der Zeit bei Raumtemperatur. **A)** und **B)** Frisch adsorbierte PM. **C)** und **D)** Dieselbe PM nach 100 Minuten. In den Falschfarbenabbildungen C und D sind die Membranhöhen mit unterschiedlichen Farben dargestellt. Grüne Bereiche sind ca. 4 nm hoch, während blaue Bereiche eine Höhe von ca. 6 nm aufweisen. Die weißen Linien in C und D markieren die Querschnitte, die unter den jeweiligen Abbildungen dargestellt sind.

Die erstaunlich große thermische Stabilität von in Puffer suspendierter PM und von Filmen aus getrockneten PM-Multilagern wurde intensiv untersucht [6, 8, 118, 119]. Purpurmembranen in wässrigen Suspensionen zeigen zwei Phasenübergänge [118, 119]: einen reversiblen Übergang bei ca. 80°C, bei dem sich der 2D-Kristall umordnet und einen irreversiblen Übergang bei ca. 100°C, der durch die thermische Denaturierung von BR gekennzeichnet ist. Getrocknete PM bleibt auch bei Temperaturen bis 140°C

stabil [6]. Diese Untersuchungen zeigen, dass BR in Form von Purpurmbranen eine im Vergleich zu anderen Proteinen sehr hohe thermische Stabilität besitzt.

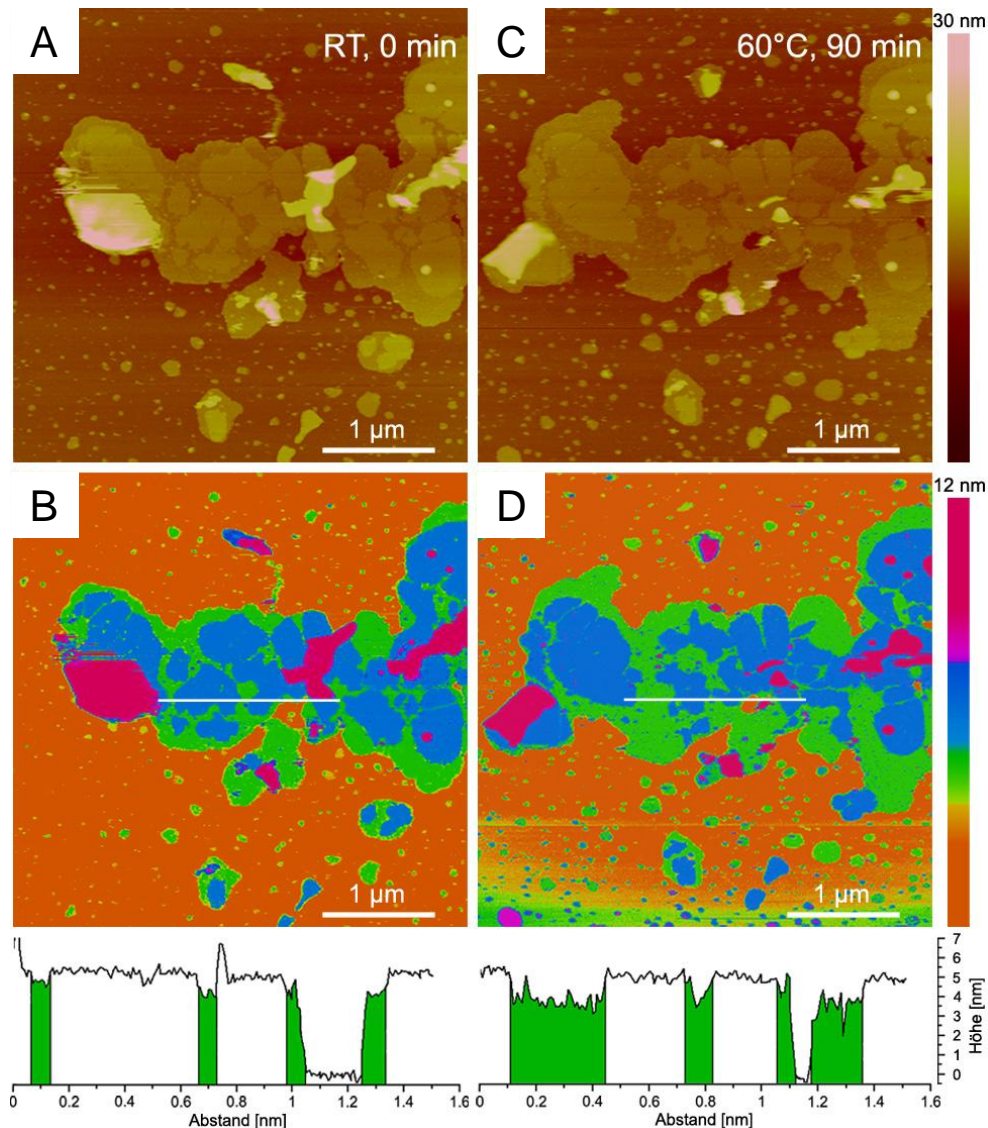


Abb. 3.13: Oberflächen-induzierte Denaturierung von Purpurmbranen auf Glimmer in Abhängigkeit von Zeit und Temperatur. **A)** und **B)** Frisch adsorbierte PMs. **C)** und **D)** Dieselben PMs 90 Minuten nachdem sie kurz einer Temperatur von 60°C ausgesetzt wurden. In den Falschfarbenabbildungen C und D sind die Membranhöhen mit unterschiedlichen Farben dargestellt. Grüne Bereiche sind ca. 4 nm hoch, während blaue Bereiche eine Höhe von ca. 6 nm aufweisen. Die weißen Linien in C und D markieren die Querschnitte, die unter den jeweiligen Abbildungen dargestellt sind.

Vergrößert man die Temperatur des Puffers, kann die in Abbildung 3.12 beobachtete Denaturierung deutlich beschleunigt werden. In Abbildung 3.13 wurde der Einfluss einer erhöhten Temperatur auf einige Purpurmbranen dargestellt. Abbildung 3.13A

und B zeigen die Membranen direkt nach der Adsorption auf Glimmer. Dann wurde der Messpuffer gegen auf 60°C erwärmten Puffer ausgetauscht. Nachdem das thermische Gleichgewicht wieder erreicht war wurden weitere *tapping mode*-AFM Aufnahmen durchgeführt. Die Fläche des 4 nm hohen Rands um die PMs vergrößerte sich um 6,4% während der Anteil an 5-6 nm hohen Membranen und Membranen in zweiter Lage um 4,4% abnahm - das Volumen der Membranen blieb konstant. Die Höhenprofile in Abbildung 3.13C und D unterstreichen den beobachteten denaturierenden Effekt (die denaturierten Bereiche sind grün markiert). Zieht man in Betracht, dass PM in Suspensionen Temperaturen von bis zu 95°C standhält [8], wird der destabilisierende Effekt der Glimmeroberfläche auf BR deutlich.

Ein „Lipidrand“ mit einer Höhe von ca. 4 nm wurde bereits mit AFM-Untersuchungen beobachtet [80], aber als Rest der Lipidmembran interpretiert, der bei der Aufreinigung der PM nicht abgetrennt wurde. Die Annahme, dass dieser Rand aus einer Membran besteht, die denaturiertes BR enthält wird, auch wenn kein direkter Beweis vorliegt, von folgenden Beobachtungen gestützt:

- Die unstrukturierten PM-Bereiche weisen eine charakteristische Höhe von 4 nm auf, während die Höhe von nativer PM bei den gewählten experimentellen Bedingungen bei 5,6 nm liegt [80]. Abweichungen der Membranhöhe zu größeren Werten wurden bei niedrigen Pufferkonzentrationen beobachtet, eine Verringerung jedoch niemals.
- Die Fläche der 4 nm hohen Bereiche vergrößert sich mit der Zeit. In gleichem Maße nehmen die nativen Bereiche ab.
- Die Höhe von Apomembranen, bei denen das Retinal chemisch aus der Bindungstasche entfernt wurde, beträgt ca. 4 nm [69].
- Im Gegensatz zu den Membranen mit normaler Höhe wurde in den 4 nm hohen Bereichen kein hexagonaler 2D-Kristall festgestellt (siehe Abb. 3.14, niedriger Bereich).
- Die veränderten Membranbereiche scheinen beweglicher als die kristallinen Membranen zu sein und können nur bei geringen Messkräften abgebildet werden (*tapping mode*-AFM).
- Die beobachteten Änderungen der Morphologie sind irreversibel.

Die Denaturierung eines PM-Bereiches konnte mit molekularer Auflösung beobachtet werden. Abbildung 3.14 zeigt die zeitaufgelöste Veränderung einer mehrere hundert Nanometer großen PM und einer weniger als 100 nm großen Membran bei Raumtemperatur. Der die kristallinen Membranen umgebende Bereich besitzt eine Höhe von 4 nm und weist keine Fernordnung auf. Der kleine Membranteil wurde von der großen Membran durch kraftspektroskopische Experimente abgetrennt. Von Abbildung 3.14B wurde eine Fouriertransformation berechnet (Ausschnitt in Abb. 3.14B). Sie zeigt, dass die beiden Membranen zueinander um einige Grad verdrehte Kristallgitter besitzen; beide Membranen sind zu diesem Zeitpunkt noch kristallin. Im Verlauf der Beobachtung ändert die kleine Membran ihre Position und schrumpft, bis sie nach 34 min verschwunden ist. Die kleine Membran besitzt ein ungünstiges Verhältnis ihres Umfangs zu ihrer Fläche. Aus diesem Grund wird die kleinere Membran weniger durch Intramembranwechselwirkungen stabilisiert und denaturiert schneller als die größere PM. Auch die Form der großen Membran verändert sich. BR-Trimere am Rand der Membran orientieren sich dynamisch um und der Bereich mit reduzierter Höhe vergrößert sich.

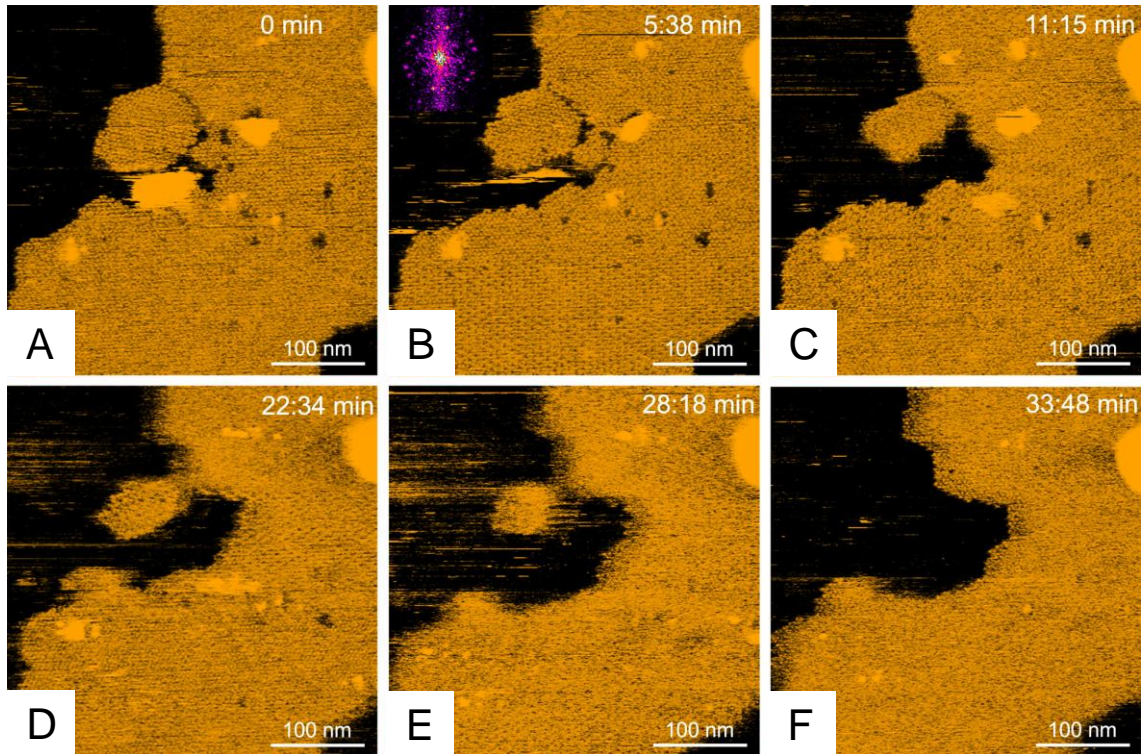


Abb. 3.14: Molekular aufgelöste Beobachtung der morphologischen Änderung einer PM auf Glimmer bei Raumtemperatur(A-F). Der 50 bis 100 nm große Membranteil im linken oberen Bereich der Bilder weist eine gegenüber der großen Membran gedreht Orientierung der Kristallstruktur auf (siehe Fourier Transformation in B). Während die große Membran stabil bleibt, verschwindet die kleine PM in einem Zeitraum von 34 Minuten.

Wird PM auf einer Oberfläche adsorbiert, bestimmt das Verhältnis von stabilisierenden und destabilisierenden Kräften, ob die Membran ihre native Form beibehält oder denaturiert wird. Beide Membranbestandteile, die Proteine und die Lipide können mit dem Substrat und mit sich selbst wechselwirken. Intramembrankräfte (E_{PM}) stabilisieren die Membran. Sie setzen sich zusammen aus BR-Lipid-, BR-BR- und Lipid-Lipid-Wechselwirkungen. Die Membran bleibt stabil, wenn diese Kräfte größer sind als die Oberflächenwechselwirkungen (E_S), die in BR-Substrat- und Lipid-Substrat-Interaktionen unterteilt werden können (Gleichung 3.1). Das Stabilitätskriterium für PM lautet:

$$E_{PM} = E_{BR-BR} + E_{Lipid-Lipid} > E_{BR-Substrat} + E_{Lipid-Substrat} = E_S \quad (\text{Gl. 3.1})$$

Die Denaturierung der Purpurmembranen ist nicht gleichmäßig über die Membranfläche zu beobachten sondern beginnt am Rand der Membranen, da die randständigen BR-Trimere weniger stabilisiert werden als die Trimere im Zentrum der Membran.

3.3.1.2 Morphologie von PM auf Gold und Silicium

Um festzustellen, ob die beobachtete Denaturierung der PM durch den Glimmer hervorgerufen wird oder ein generelles Phänomen ist, das durch die Instabilität des hexagonalen 2D-Kristalls der PM bedingt ist, wurden PM auf TSG-Substraten und auf Siliciumwafern untersucht.

Auf den weniger hydrophilen TSG-Substraten adsorbierten unter denselben Bedingungen (Puffer, Temperatur, Inkubationszeit) weniger Membranen. Die Messung der PM war schwieriger als auf Glimmer, da die Membranen leichter zerstört wurden, wenn die Messkräfte zu hoch waren. Wie in Abbildung 3.15A und B gezeigt, konnte keine Denaturierung der Membranen durch die Goldoberfläche festgestellt werden. Die Höhe der Membranen betrug auch an ihrem Rand ca. 6,5 nm.

Siliciumwafer waren noch weniger mit Purpurmbranen bedeckt als TSG-Substrate bei den gleichen experimentellen Bedingungen. Die Membranen waren noch fragiler und konnten nur unter minimalen Kräften zwischen AFM-Spitze und Substrat analysiert werden. Ebenso wie die auf TSG-Substraten adsorbierten Membranen konnten auch hier direkt nach der Adsorption keine Anzeichen für eine Denaturierung gefunden werden (Abb. 3.15C und D). Nach längerer Zeit (16 h) wurde jedoch auch auf Silicium eine beginnende Denaturierung am Rand der Membranen beobachtet (Abb. 3.16).

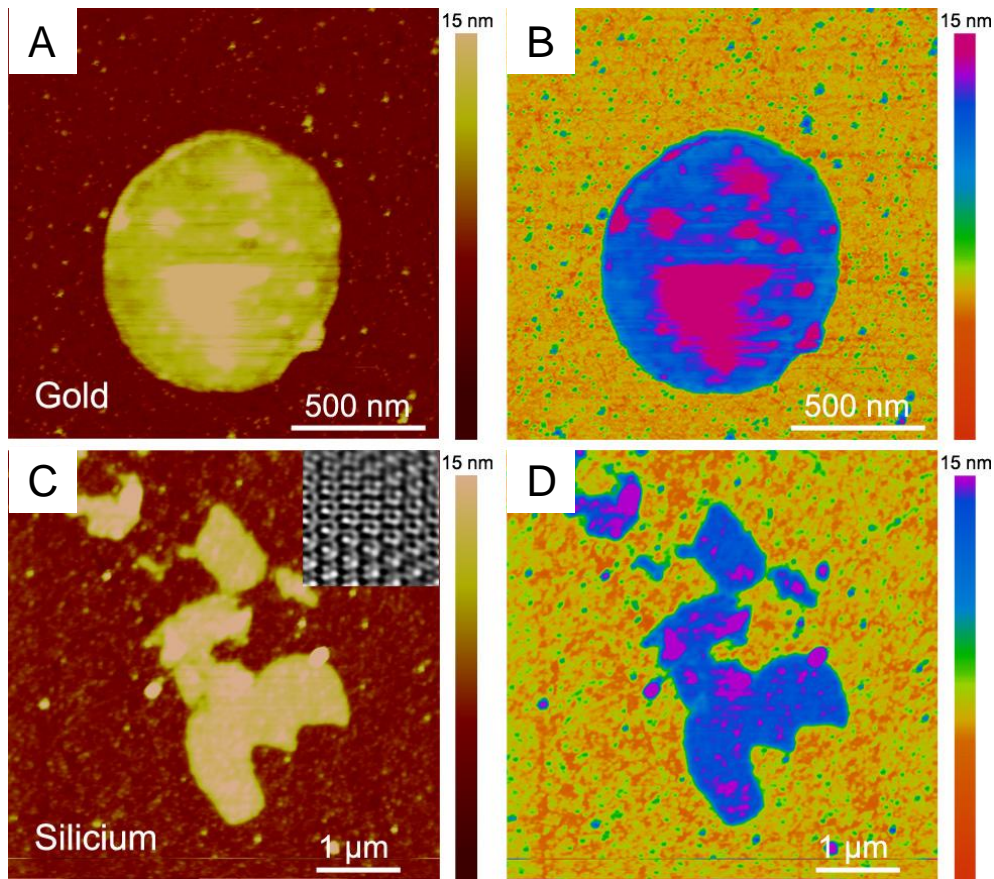


Abb. 3.15: Purpurmembran auf TSG- und Silicium-Substrat. **A)** und **B)** 6,5 nm hohe PM auf Gold. **C)** und **D)** PM auf Silicium. Die Höhe der Membran beträgt ca. 7,4 nm. Der Ausschnitt zeigt die hexagonale Struktur der Membran. Auf beiden Substraten wurden keine denaturierten Bereiche festgestellt.

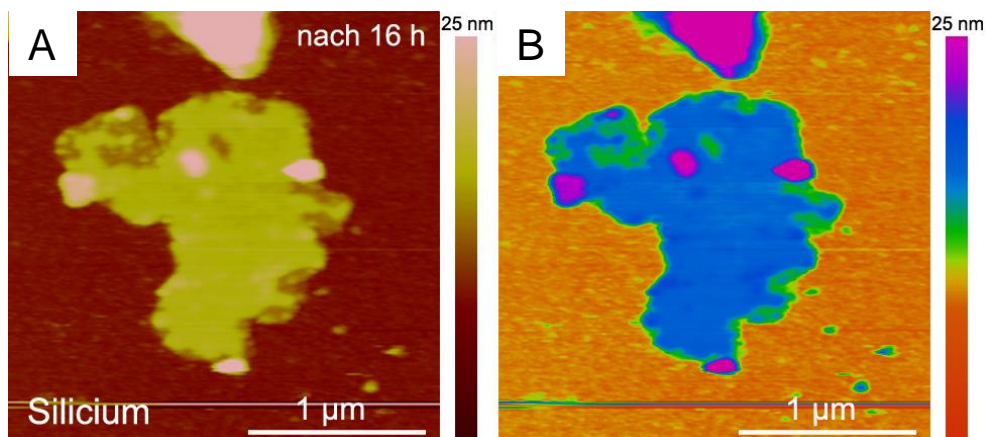


Abb. 3.16: AFM-Aufnahme einer Purpurmembran auf Silicium nach einer Inkubationszeit von 16 h. Der Rand der Membran weist eine Höhe von ca. 4 nm auf (grüne Bereiche in B).

3.3.1.3 Morphologie von PM auf modifizierten Glimmersubstraten

Um die in Kap. 3.3.1.1 diskutierte Denaturierung der Purpurmembranen zu verringern wurde die Glimmeroberfläche modifiziert. Dabei stellte sich heraus, dass Polyaminosäuren die Oberflächeneigenschaften des Glimmers stark verändern können, ohne die Rauigkeit der Oberfläche zu sehr zu vergrößern. Der Glimmer wurde mit der in neutralem Puffer positiv geladenen Polyaminosäure Poly-L-Lysin und der negativ geladenen Polyaminosäure Polyasparaginsäure belegt und die Morphologie von darauf adsorbierten PMs analysiert.

Die Abbildungen 3.17A und B zeigen die Morphologie von PMs, die fünf Stunden auf mit Poly-L-Lysin belegtem Glimmer inkubiert wurden. Die Membranen weisen eine stärkere Denaturierung auf, als auf unbehandeltem Glimmer (Abb. 3.12).

PM auf mit Poly-L-Lysin belegtem Glas wurde bereits mit elektronenmikroskopischen Methoden untersucht [48, 120]. Dabei wurde festgestellt, dass die Membranen bevorzugt mit der zytoplasmatischen Seite zum Substrat gewandt waren. AFM-Untersuchungen bestätigten dieses Ergebnis [79]. Müller et al. berichteten, dass es schwierig war molekulare Auflösungen der PM zu erhalten. Die erhaltenen hochaufgelösten Strukturen erschienen deformiert. Diese Ergebnisse können mit der in dieser Arbeit beobachteten Denaturierung der PM erklärt werden. Die AFM-Aufnahmen wurden im *contact mode* durchgeführt, weshalb die denaturierten Membranen nicht abgebildet werden konnten. Die Belegung des Substrats war ebenso wie in dieser Arbeit beobachtet im Vergleich zu unbehandeltem Glimmer hoch.

Auf mit Polyasparaginsäure belegtem Glimmer zeigt sich nach vier Stunden Inkubationszeit eine im Vergleich zu unbehandeltem Glimmer geringere Denaturierung der PMs (Abb. 3.17C und D). Nur an einer Stelle am Rand der PM wurde ein 4 nm hoher Bereich beobachtet (Pfeil in Abb. 3.17 D). Die übrige Membran weist eine konstante Höhe von ca. 5,6 nm auf. Wie auf Silicium-Substraten war auch hier die Belegung mit PM gering.

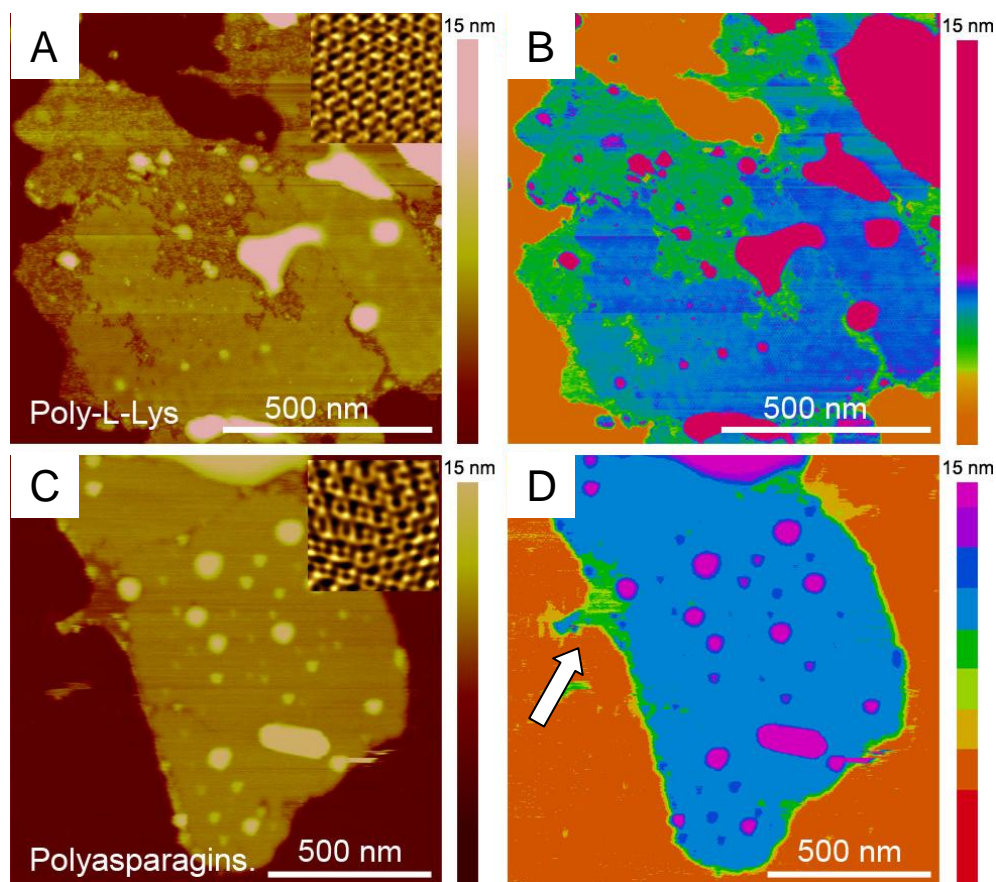


Abb. 3.17: Purpurmembran auf modifizierten Glimmer-Substrat. **A)** und **B)** Teilweise denaturierte PM auf mit Poly-L-Lysin belegtem Glimmer. Die Inkubationszeit betrug 5h. **C)** und **D)** Fast vollständig intakte PM auf mit Polyasparaginsäure belegtem Glimmer nach einer Inkubationszeit von 4h. Die Ausschnitte in A und C zeigen die hexagonalen Strukturen der nicht denaturierten Membranbereiche.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Denaturierung der PM von der Oberflächenbeschaffenheit der gewählten Substrate abhängt. Unbehandelter und mit Poly-L-Lysin modifizierter Glimmer wirkt denaturierend auf PM. Auf Silicium, Gold und mit Polyasparaginsäure belegtem Glimmer wurde ein deutlich geringerer denaturierender Effekt und eine Reduzierung der Belegung mit PM beobachtet.

3.3.1.4 Qualitative Analyse der Oberflächenkräfte

Die komplexen Wechselwirkungen die zwischen einem Substrat und einer Probe auftreten sollen in diesem Kapitel qualitativ betrachtet werden. Im Folgenden sind die Kräfte beschrieben, die zwischen zwei sich annähernden Objekten wirken können. Die

Stärke dieser Kräfte ist abhängig von der Beschaffenheit der Objekte und ihrem Abstand zueinander:

- Die attraktiven **van-der-Waals Kräfte** wirken zwischen (induzierten) Dipolen. Sie sind u. a. abhängig von der Polarisierbarkeit der Stoffe und werden nur in geringem Maße von pH-Wert und Elektrolytkonzentration des Puffers beeinflusst. Die Hamakerkonstant (H_a) ist ein Maß für die Stärke der van-der-Waals Kräfte.
- **Elektrostatische Kräfte** wirken zwischen geladenen Objekten. Die Stärke dieser Kräfte wird von der Ladungsdichte und den Eigenschaften des Puffers (pH-Wert, Elektrolytkonzentration, Permittivität des Lösungsmittels) bestimmt.
- **Hydrophobe Kräfte** treten auf, wenn ein hydrophober Stoff von einem polaren Lösungsmittel umgeben ist. Die polaren Moleküle ordnen sich so an, dass sie möglichst wenige Wasserstoffbrückenbindungen aufgeben müssen. Durch die erzwungene starre Anordnung nimmt die Zahl ihrer Freiheitsgrade ab. Der enthalpische Vorteil wird mit einem Entropieverlust erkaufte.
- Nähern sich zwei Objekte sehr nah aneinander an (wenige Nanometer), treten repulsive **sterische Kräfte** auf.
- **Spezifische Kräfte** wie kovalente Bindungen, Salzbrücken oder Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Objekten können ebenfalls auftreten.

Das komplizierte Wechselspiel dieser Kräfte ist nicht im Detail verstanden und kann nur mit großem Aufwand für reale Fälle berechnet werden. Die Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek (DLVO) Theorie (Gleichung 3.2) umfasst die Abstandsabhängigkeit (z) der van-der-Waals Kräfte (F_{vdW}) und der elektrostatischen Kräfte (F_{el}). Sie kann, obwohl sie eine starke Vereinfachung darstellt, die Wechselwirkungen an Oberflächen bis zu einer Entfernung von wenigen Nanometern gut beschreiben [121].

$$F_{DLVO}(z) = F_{el}(z) + F_{vdW}(z) = \frac{2\sigma_s\sigma_p}{\varepsilon_e\varepsilon_0} e^{-z/\lambda_D} - \frac{H_a}{6\pi z^3} \quad (\text{Gl. 3.2})$$

Wobei σ_s die Oberflächenladung des Substrats, σ_p die Oberflächenladung des adsorbierten Objekts, ε_0 die elektrische Permittivität des Vakuums und ε_e die Permittivität des Elektrolyten ist. λ_D ist die Debye-Länge des Puffers.

Wird ein Feststoff von einem Puffer bedeckt, bildet sich auf seiner Oberfläche häufig eine permanente Ladung aus, die durch den Austausch von Ionen und Protonen zwischen der Lösung und dem Feststoff zustande kommt. Die Dissoziations- und

Bindungsrate der Ionen hängt vom pH-Wert und der Elektrolytkonzentration des Puffers ab. Durch Gegenionen des Puffers wird die Oberflächenladung kompensiert. Es bildet sich eine elektrolytische Doppelschicht aus, deren Dicke aus der Konzentration der Gegenionen (c) berechnet werden kann. Für die Debye-Länge der Doppelschicht monovalenter wässriger Elektrolyte bei 25°C gilt Gleichung 3.3 [121]:

$$\lambda_D = \frac{0,304}{\sqrt{c}} \text{ [nm]} \quad (\text{Gl. 3.3})$$

Werden Purpormembranen (negative Ladung [122]) bei niedrigen Salzkonzentrationen des Puffers auf Glimmer (negative Ladung durch die Dissoziation von Kaliumionen) adsorbiert, sind die elektrostatischen Interaktionen repulsiv. Erhöht man die Konzentration des Puffers verringert sich die Abstoßung und die attraktiven van-der-Waals Kräfte überwiegen [53, 54, 80].

Da die Oberfläche der Siliziumwafer oxidiert ist, müssen die Wechselwirkungen zwischen einer Silikatschicht und PM betrachtet werden. Wird eine Silikatoberfläche mit Wasser bedeckt, dissoziieren Silanol-Gruppen (Gleichung 3.4). Eine negative Oberflächenladung ist die Folge:



Abbildung 3.18 zeigt mit dem AFM gemessene Kraft-Abstandskurven auf Glimmer und einem oxidierten Siliciumwafer. Der Verlauf der Kraftkurve zeigt, dass die Siliciumoberfläche eine starke negative Ladung besitzt. Sie wird von der ebenfalls negativ geladenen Si_3N_4 -AFM-Spitze bei der Annäherung an die Oberfläche abgestoßen. Dabei wird die repulsive Kraft schon bei einem Abstand von ca. 30 nm kontinuierlich größer (gestrichelte Linie). Dagegen steigt die Durchbiegung des Federbalkens und somit die auf die Spitze wirkende repulsive Kraft auf Glimmer plötzlich beim Erreichen der Oberfläche an (durchgezogene Linie). Die negative Ladung des Wafers ist demnach größer als die des Glimmers.

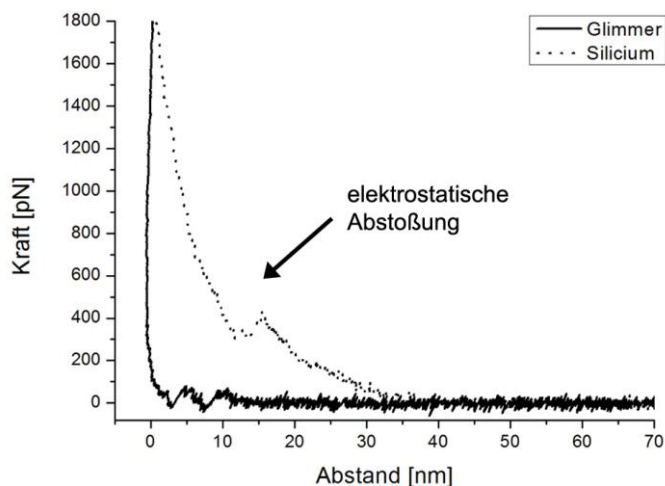


Abb. 3.18: Kraft-Abstandskurven aufgenommen auf Glimmer (durchgehende Linie) und auf Silicium (gepunktete Linie). Die Messungen wurden im Messpuffer durchgeführt (300 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,8).

In Abbildung 3.19 werden die berechneten DLVO-Kräfte, die zwischen PM und den Substraten Glimmer, Gold und Silicium wirken, verglichen. Für Glimmer wurden zwei Elektrolytkonzentrationen des Messpuffers aufgetragen. Die für die Berechnung verwendeten Parameter sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst. Die getesteten Oberflächen unterscheiden sich in ihrer Oberflächenladung und ihrer Hamakerkonstante, die von der Polarisierbarkeit und der Dichte der Stoffe abhängt. Gold weist die geringste Oberflächenladung der drei Materialien auf [123]; PM sollte auf Goldoberflächen eine kleinere elektrostatische Abstoßung erfahren als auf Glimmeroberflächen. Siliciumoxid-Oberflächen zeigen eine größere Oberflächenladung als Glimmer. Dies wurde durch die Messung von Kraft-Abstand-Kurven bestätigt (Abb. 3.18). Unter den verwendeten Pufferbedingungen ist die Oberfläche des oxidierten Si-Wafers von einer repulsiven Aura umgeben, die die AFM-Spitze abstößt und PM daran hindert zu adsorbieren. Tatsächlich wurde bei Elektrolytkonzentration von 0,3M KCl eine im Vergleich zu Glimmer geringe Belegung der Silicium-Wafer mit Purpurmbranen beobachtet. Gold besitzt die attraktivsten DLVO-Kräfte, die Experimente zeigen aber, dass PM schwächer an die Goldoberfläche gebunden zu sein scheint, als an Glimmer. Diese Beobachtung ist mit der Rauigkeit der getesteten Oberflächen erklärbar. Während die DLVO-Theorie auf der Näherung zweier vollkommen flacher Oberflächen basiert, weisen Glimmer, Gold und Si-Wafer eine unterschiedliche Rauigkeit auf. Glimmer ist über Mikrometer atomar flach (Rauigkeit $R_a = 0,051$ nm), wogegen TSG-Substrate ($R_a = 0,164$ nm) und Siliciumwafer ($R_a = 0,171$ nm) Höhenänderungen im Ångström-Bereich besitzen. Diese Fluktuationen können die van-der-Waals Kräfte reduzieren und so zu einer Verringerung der attraktiven Kräfte zwischen PM und Unterlage führen.

Die Oberflächeneigenschaften des Glimmers wurden durch die Belegung mit Polyaminosäuren modifiziert. Der Glimmer erhielt durch Poly-L-Lysin eine positive Oberflächenladung, die zu einer Verstärkung der attraktiven Kräfte zwischen PM und Substrat führte. Die Konsequenz war eine Zunahme des denaturierenden Effekts und eine Steigerung der Belegung mit PM. Die negative Polyaminosäure Polyasparaginsäure verstärkte die negative Ladung des Glimmers. Ähnlich wie bei auf dem stark negativ geladenen Siliciumwafer wurde die Denaturierung verringert. Auch hier wurde ein kleiner Belegungsgrad mit PM festgestellt.

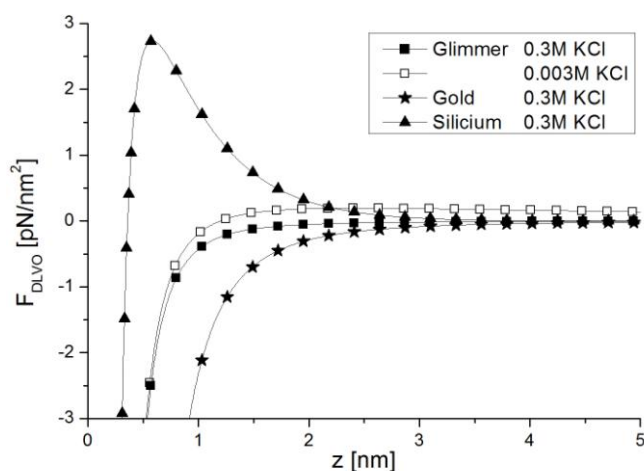


Abb. 3.19: Qualitatives Modell der zwischen PM und verschiedenen Oberflächen wirkenden Kräfte. Zur Berechnung wurde die DLVO-Theorie benutzt. Drei verschiedene Substrate wurden betrachtet (Glimmer, Gold und Silicium). Für Glimmer wurde zusätzlich die Ionenstärke des Puffers variiert (0,003 M und 0,3 M, pH 7,8). Änderungen der Pufferkonzentrationen scheinen geringere Auswirkungen auf die Wechselwirkungen zu haben als das Material des Substrats. Nach der DLVO-Theorie hat Gold die stärksten anziehenden Wechselwirkungen, während zwischen Silizium-Oberflächen und PM repulsive Kräfte wirken. Die Kräfte wurden für atomar flache Substrate berechnet – die Rauigkeit der Oberflächen wird hier nicht berücksichtigt.

DLVO- Parameter		Glimmer	Gold	Si-Wafer
σ_s [C/m ²]	Oberflächenladung (Substrat)	-0,0025 [124]	-0,0014 [123]	-0,085 [125]
σ_p [C/m ²]	Oberflächenladung (PM)	-0,05 [122]		
ϵ_0 [C/Vm]	Dielektrizitätskonstante (Elektrolyt)	80,20 ^a [126]		
H_a (A-A) [J·10 ⁻²⁰]	Hamaker Konstante (Substrat-Substrat)	1,34 [127]	31 [128]	0,48 [127]
H_a (A-B) [J·10 ⁻²⁰]	Hamaker Konstante (Substrat-PM ^b)	0,92 ^c	4,42 ^c	0,55 ^c

^a bei 20 °C, 0,1 MPa. ^b $H_a(\text{PM}) = 0,63 \cdot 10^{-20}$ J [128]. ^c berechnet nach [121].

Tab. 3.4: DLVO-Parameter der drei verwendeten Substrate. Die Parameter wurden zur Berechnung der Abstandsabhängigkeiten der DLVO-Kräfte in Abbildung 3.19 verwendet. Da der Silicium-Wafer oxidiert war wurde eine Silikatoberfläche angenommen. Die Hamakerkonstante für PM ist nicht bekannt – als Näherung wurde H_a von Kohlenwasserstoffen in Wasser benutzt.

Neben den DLVO-Kräften können andere Kräfte wie hydrophobe Kräfte, sterische Kräfte und spezifische Kräfte die Wechselwirkungen zwischen PM und der betrachteten Oberfläche erhöhen. Eine starke attraktive Wechselwirkung wie sie auf Glimmer beobachtet wird, ist wünschenswert, da sie durch die geringe Drift der Probe zu subatomar aufgelösten Bildern führt. Starke Kräfte, insbesondere spezifische Wechselwirkungen, können aber auch einen denaturierenden Effekt auf die Probe haben. Müller et al. entdeckten einen Einfluss unterschiedlicher Messkräfte auf die Morphologie der PM [60]. Aus kraftspektroskopischen Experimenten ist bekannt, dass BR-Monomere schon bei Kräften um 100 pN aus der PM extrahiert werden können [93]. Diese Resultate zeigen, dass Kräfte im Bereich von wenigen hundert pN starke Effekte auf PM haben. Gerade an den Rändern der Membranen, an denen die BR-Trimere eine geringere Stabilisierung durch Intramembrankräfte erfahren, können starke attraktive Kräfte mit dem Substrat zu einer fortschreitenden Denaturierung der PM führen. Auf Siliciumwafern und mit Polyasparaginsäure behandeltem Glimmer sind die Wechselwirkungen mit PM schwächer – die Denaturierung ist auf diesen Substraten

abgeschwächt. Die Ergebnisse der Morphologieuntersuchungen sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst.

Substrat		PM-Denaturierung	PM-Belegung
Glimmer	Abb. 3.12 Abb. 3.13	mittel	hoch
Glimmer + Poly-L-Lys	Abb. 3.17	viel	hoch
Glimmer + Poly-Asp	Abb. 3.17	wenig	gering
Gold	Abb. 3.15	keine	gering
Silicium	Abb. 3.15 Abb. 3.16	wenig	gering

Tab. 3.5: Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Untersuchungen der PM-Morphologie.

3.3.2 Bleichen von PM

Untersuchungen an Retinal-freien Halobakterien ergaben, dass die Bindung des Retinals an das Lysin 216 eine Voraussetzung für die Bildung des hexagonalen 2D-Kristalls der BR-Trimere in PM ist [129]. Retinal-defiziente Halobakterien erzeugen sogenannte weiße Membran (*white membrane*), die eine geringere Ordnung als PM besitzt [130]. In Kulturen von Halobakterien, denen Nicotin zugesetzt wurde, wird die Retinal-Produktion gehemmt. Die Bakterien erzeugen braune Membranen (*brown membrane*), denen die kristalline Anordnung der Proteine fehlt [131, 132]. Sowohl weiße als auch braune Membran kann durch Zugabe von Retinal in PM überführt werden [133, 134].

Auch in vitro kann eine retinalfreie Membran erzeugt werden. Dazu wird eine PM-Suspension mit einem Überschuss Hydroxylamin versetzt und belichtet. Die Bindung zwischen der Aminosäure 216 und dem Retinal wird gespalten [68, 135]. Es entsteht Bakterioopsin (BO). Das Retinal reagiert zu Retinaloxim, dass unspezifisch in der Membran gelöst bleibt (Abb. 3.20).

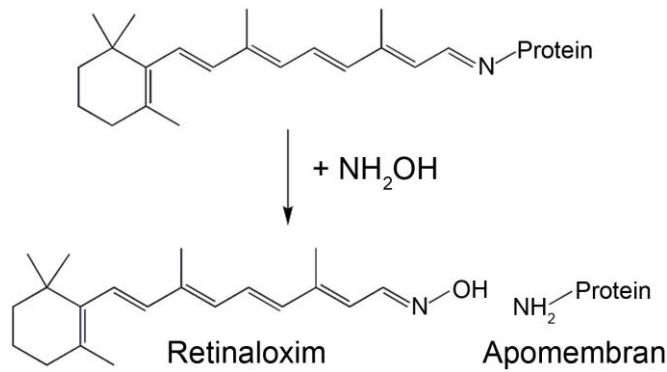


Abb. 3.20: Die Schiff'sche Base im BR kann mit Hydroxylamin (NH_2OH) gespalten werden. Das Lysin 216 ist nun frei, während das entstehende hydrophobe Retinaloxim unspezifisch in der Membran gelöst ist.

Die BO haltigen Membranen (Apomembranen) erscheinen farblos. Abbildung 3.21 zeigt ein UV-Vis-Spektrum einer PM-Suspension vor (schwarze Kurve) und nach (rote Kurve) dem Bleichen. Auch Apomembran kann wie weiße und braune Membran durch Retinal regeneriert werden. Eine weitere Möglichkeit PM wieder zu erzeugen stellt die Rückreaktion von Retinaloxim mit K216 dar (grüne Kurve). Diese Reaktion findet statt, wenn der NH_2OH -Überschuss aus der Apomembransuspension entfernt wird. In Suspension können durch Retinalzugabe bis zu 85% der BR-Monomere regeneriert werden [69].

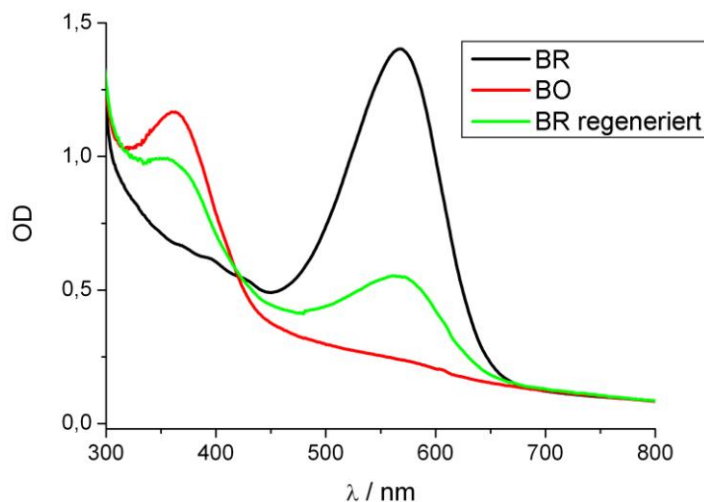


Abb. 3.21: UV-Vis-Spektren von Purpurmembranmodifikationen in Suspension. BR zeigt eine starke Absorption bei 570 nm (schwarze Kurve). Nach Zugabe von Hydroxylamin wurde BR zu Bakterioopsin (BO) gebleicht; es ist keine Absorption am Absorptionsmaximum von BR messbar. Bei ca. 360 nm absorbiert das in der Membran unspezifisch gelöste Retinaloxim (rote Kurve). Durch Regeneration bildet sich wieder BR (grüne Kurve).

Abbildung 3.22 zeigt den Verlust des hexagonalen 2D-Kristalls, der durch die Spaltung der Schiff'schen Base zwischen Chromophor und Protein hervorgerufen wird. Während die BR-Trimere in der unbehandelten PM kristallin angeordnet sind (Abb. 3.22A), verlieren sie nach dem Bleichen ihre Fernordnung. Die Quartärstruktur des Proteins bleibt jedoch erhalten; in Abbildung 3.22B sind ungeordnete BR-Trimere als Kreise mit ca. 6 nm Durchmesser zu erkennen.

Der Verlust der kristallinen Anordnung der BR-Trimere durch Bleichen kann als eine Art Schmelzen des Kristalls bei Raumtemperatur angesehen werden. Tatsächlich löst sich der 2D-Kristall beim ersten Phasenübergang der PM (ca. 80°C) reversibel auf [136, 137].

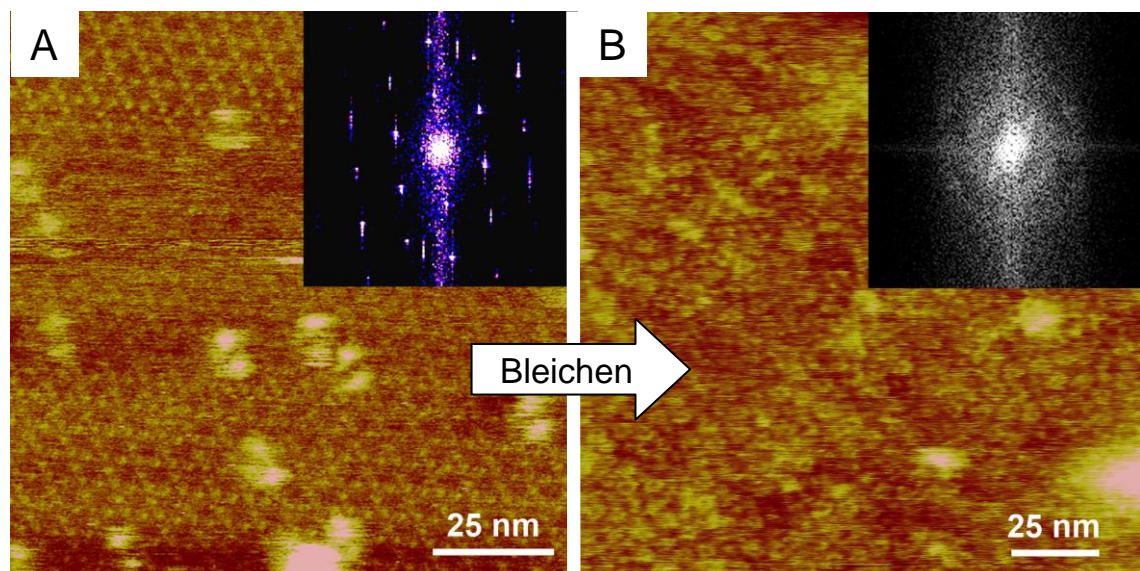


Abb. 3.22: Molekular aufgelöste AFM-Aufnahmen einer PM auf Glimmer vor (A) und nach (B) dem Bleichen mit Hydroxylamin. Die Hexagonale Struktur in A) wird aufgelöst während die BR-Trimere (wenige nm große Kreise in B) erhalten bleiben. Die Fouriertransformationen verdeutlichen den Verlust der zwei-dimensionalen Ordnung.

3.3.3 Fusion durch Regeneration

Wird der Kristallverbund der BR-Trimere aufgelöst, besteht das Problem der unterschiedlichen Orientierungen von aneinandergrenzenden Membranen nicht mehr. Nach Adsorption der gebleichten Membranen auf einem Substrat können zwei benachbarte Membranen nun fusionieren. Um eine große PM-Monolage zu erhalten, benötigt man eine möglichst dichte Bedeckung der Oberfläche mit Apomembranen. In Kapitel 3.3.1 wurden die Auswirkungen verschiedener Oberflächen auf die Morphologie der PM und den Grad ihrer Bedeckung diskutiert. Es stellte sich heraus, dass Oberflächen mit starker negativer Oberflächenladung deutlich geringere denaturierende Effekte auf PM haben als unmodifizierter Glimmer. Die Silicioberflächen und der mit Polyasparaginsäure belegte Glimmer waren jedoch nur zu einem geringen Teil mit PM belegt. Aus diesem Grund wurde für die folgenden Regenerationsexperimente unbehandelter Glimmer als Substrat gewählt.

Stellt man die Kristallstruktur durch Zugabe von Retinal oder durch die Rückreaktion des Lysin 216 mit Retinaloxim wieder her [69, 71], erhält man fusionierte PM. In Abbildung 3.23 sind mehrere benachbarte PMs vor (Abb. 3.23A) und nach (Abb. 3.23B) der Regeneration mit Retinal gezeigt. Vor dem Regenerieren erkennt man zwei Regionen in denen die Apomembranen überlappen (Pfeile). Die Überlappungsstellen sind nach der Regeneration nicht mehr vorhanden; es hat sich eine durchgehende Membran gebildet. Betrachtet man Abbildung 3.23B genauer, erkennt man, dass die fusionierte Membran aus unterschiedlich hohen Bereichen besteht. Die höheren Bereiche (ca. 6 nm) besitzen Durchmesser von 50-100 nm und sind von einer ca. 4,5 nm hohen Membran umgeben.

Molekular aufgelöste AFM-Bilder der regenerierten Membranen (Abb. 3.24) zeigen, dass die höheren Membranbereiche kristallin sind und eine zueinander verdrehte Orientierung aufweisen (Abb. 3.24B). Die umgebenden Bereiche besitzen keine Ordnung, ihre Höhe entspricht der von Apomembranen oder denaturierter PM (Kap. 3.3.1). Die fusionierten PMs sind also nur teilweise regeneriert.

Um den Anteil der Regeneration zu steigern wurde das Verhalten der polykristallinen Membranen und der Einfluss von äußeren Faktoren auf die Rekristallisation der Apomembranen untersucht.

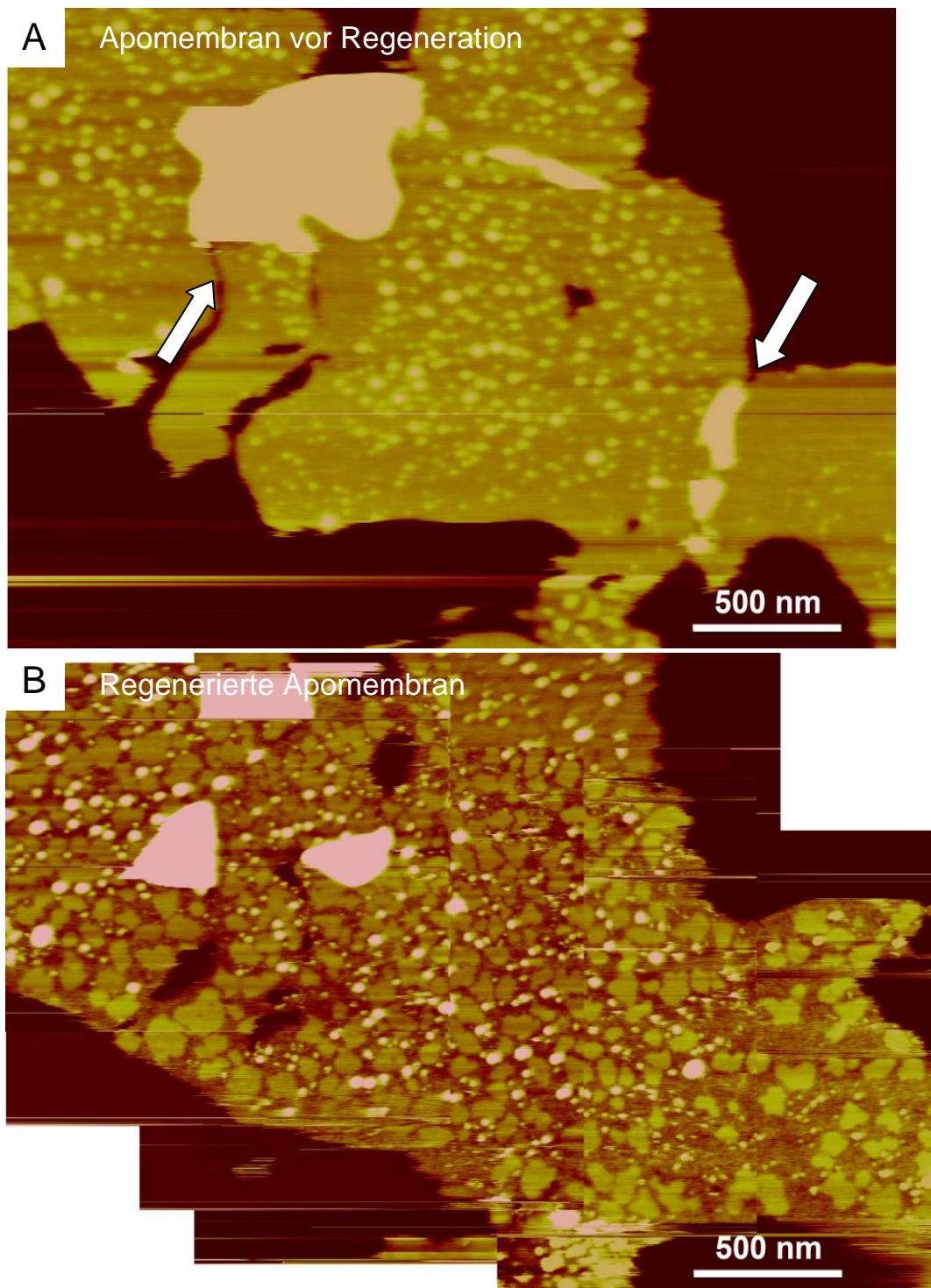


Abb. 3.23: *Contact-Mode-AFM* Aufnahme mehrerer überlappender Membranen vor und nach der Regeneration mit Retinal. **A)** Mit Hydroxylamin gebleichte Purpurmembranen. Die Membranen überlappen an den mit Pfeilen markierten Stellen. **B)** Dieselben Membranen ca. 4 Stunden nach Zugabe von 10 μL ethanolischer Retinallösung (0,01%) in 100 μL Messpuffer (Die Abbildung ist aus mehreren AFM-Aufnahmen zusammengesetzt). Die fusionierten Membranen bestehen aus vielen ca. 100 nm großen regenerierten Bereichen (Höhe 5,5 nm), die von nicht regenerierten Bereichen (Höhe 4,5 nm) umgeben sind. Die Überlappungsstellen sind nach der Regeneration nicht mehr zu erkennen.

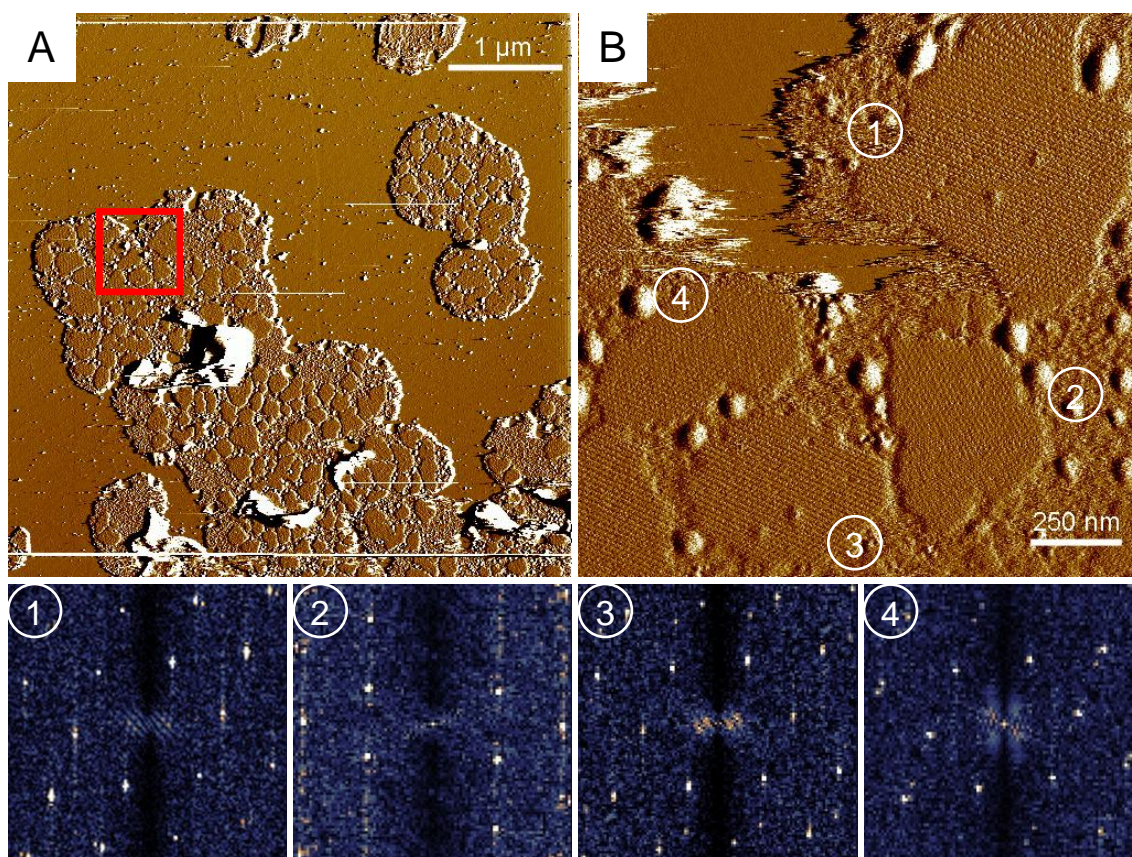


Abb. 3.24: Contact-Mode-AFM Aufnahme (Durchbiegungsbilder) von regenerierten Purpurmembranen. **A)** Die Übersichtsaufnahme zeigt mehrere, durch die Zugabe von wenig ethanolischer Retinallösung (1 µL) regenerierte, Purpurmembranen. Die Membranen bestehen aus vielen 100-300 nm großen kristallinen Bereichen. Der rote Bereich wurde vergrößert abgebildet. **B)** Vergrößerter Bereich aus A) mit molekularer Auflösung. Die kristallinen Bereiche (im Bild markiert mit 1-4) weisen eine unterschiedliche Orientierung auf, wie die Fouriertransformationen 1-4 zeigen.

3.3.3.1 Untersuchung von polykristallinen Membranen

Zeitaufgelöste AFM-Aufnahmen der teilweise regenerierten polykristallinen Membranen werden in Abbildung 3.25 gezeigt. Die Beobachtungen deuten darauf hin, dass die 50-100 nm großen kristallinen Bereiche in den Membranen beweglich sind. Auch ihre Form verändert sich und die Bereiche scheinen zu fusionieren. Die teilkristallinen Membranen sind demnach auch bei Raumtemperatur nicht starr. Die BR-Monomere können ständig durch die Rückreaktion von Retinaloxim und Apoprotein regenerieren und aufgrund von äußeren Faktoren wie der Wechselwirkung mit dem Substrat denaturieren.

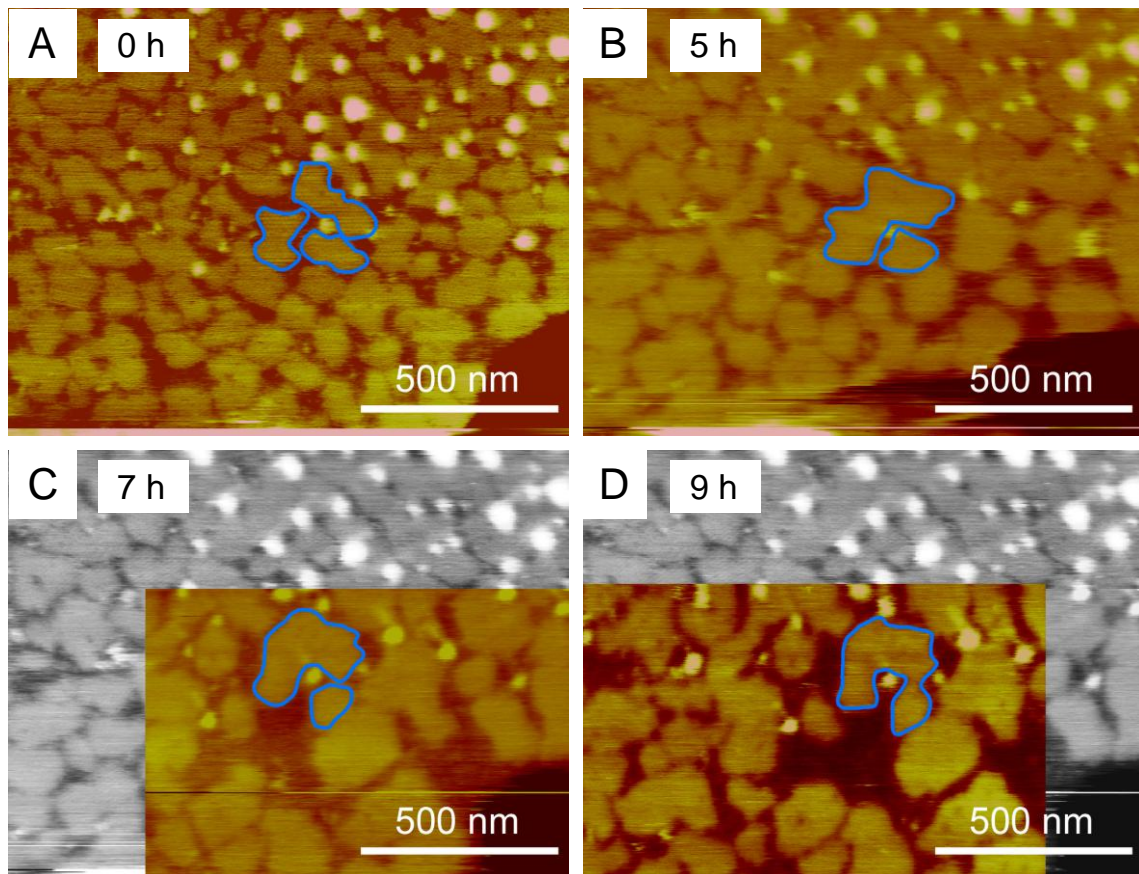


Abb. 3.25: AFM Aufnahme von regenerierten polykristallinen Purpurmembranen. Die in Graustufen gezeigten Bildteile wurden aus dem vorangegangenen Bild übernommen. **A)** Ohne Retinal-Zugabe regenerierte PM. **B)** Derselbe Membranteil nach Zugabe von wenig ethanolischer Retinallösung und einer Inkubationszeit von 5 h. **C)** nach 7 h. **D)** nach 9 h. Die kristallinen Bereiche scheinen in der Membran beweglich zu sein und zu fusionieren (blau umrandete Bereiche).

3.3.3.2 Beeinflussung der Regeneration

Verschiedene Faktoren, die die Stabilität von Biomolekülen auf Oberflächen beeinflussen, wurden bereits in Kapitel 3.3.1 besprochen. Diese Faktoren können nicht nur die Denaturierung der BR-Moleküle einleiten sondern auch die Regeneration der Apomembran fördern oder behindern. Die Tendenzen sind zum Teil gegenläufig und wurden empirisch untersucht. Dabei wurde deutlich, dass die Apomembranen weniger stabil sind als unbehandelte PM, da sie nicht durch einen 2D-Kristall stabilisiert werden. Im Folgenden soll auf die wichtigsten Faktoren und ihre Auswirkung auf einen möglichst hohen Anteil an regenerierter PM eingegangen werden:

Temperatur: Apomembran regeneriert auf Oberflächen bei Raumtemperatur nur langsam. Bei Temperaturen über 70°C wird eine gesteigerte Denaturierung beobachtet. Die Temperatur erhöht einerseits die Regenerationsgeschwindigkeit, aber auch die Geschwindigkeit der Denaturierung. Die besten Ergebnisse wurden bei Temperaturen von 60 bis 65°C erzielt.

Lösungsmittel: Es wurde ein starker Einfluss des Ethanol, in dem das hydrophobe Retinal gelöst war, beobachtet. Die instabilen Apomembranen wurden schon bei geringen Ethanolkonzentrationen zum Teil denaturiert, die nicht gebleichte Membranen in Suspension überstehen [7, 138]. Um den denaturierenden Einfluss des Retinallösungsmittels möglichst gering zu halten, wurden die adsorbierten Apomembranen kurze Zeit nach der Retinalzugabe mit einem Puffer gewaschen. Abbildung 3.26A zeigt regenerierte Apomembranen nach einer Kontaktzeit von 30 Minuten mit der Retinallösung. Die kristallinen Bereiche sind mit mehreren µm größer als durchschnittliche PM. Beträgt die Kontaktzeit 2 h ist die Denaturierung weiter vorangeschritten und die nicht regenerierten Bereiche scheinen sich aufzulösen (Abb. 3.26B, schwarze Bereiche).

Retinalkonzentration: Durch eine erhöhte Retinalkonzentration (mit der auch immer eine Vergrößerung der Ethanolkonzentration in der Lösung einherging), wurde die Anzahl an „Kristallisationskeimen“ erhöht. Dies führte zu einer größeren Anzahl von kleinen kristallinen Bereichen und nicht zu einer Vergrößerung der regenerierten Fläche (Abb. 3.26C).

Substrat: Schwache Wechselwirkungen zwischen Substrat und Membran wären ideal, um die Denaturierung auf der Oberfläche gering zu halten und durch eine größere Beweglichkeit der Trimere die Regeneration zu fördern. Der Vorteil des hier verwendeten Glimmers ist seine geringe Rauigkeit und die geringe Drift der adsorbierten Membranen, die eine Untersuchung der Regeneration von gebleichter PM auf Oberflächen erst möglich machten. Durch die starken attraktiven Wechselwirkungen zwischen PM und Glimmer wurde ein hoher Belegungsgrad mit Apomembranen erhalten (meist ca. 90%), der auf modifiziertem Glimmer und Silicium nicht erreicht werden konnte.

Der höchste Grad an Regeneration erfolgte ohne Retinalzugabe. Ohne den denaturierenden Effekt des Retinallösungsmittels wurden ca. 2/3 der mit Apomembran belegten Oberfläche regeneriert (Abb. 3.26D).

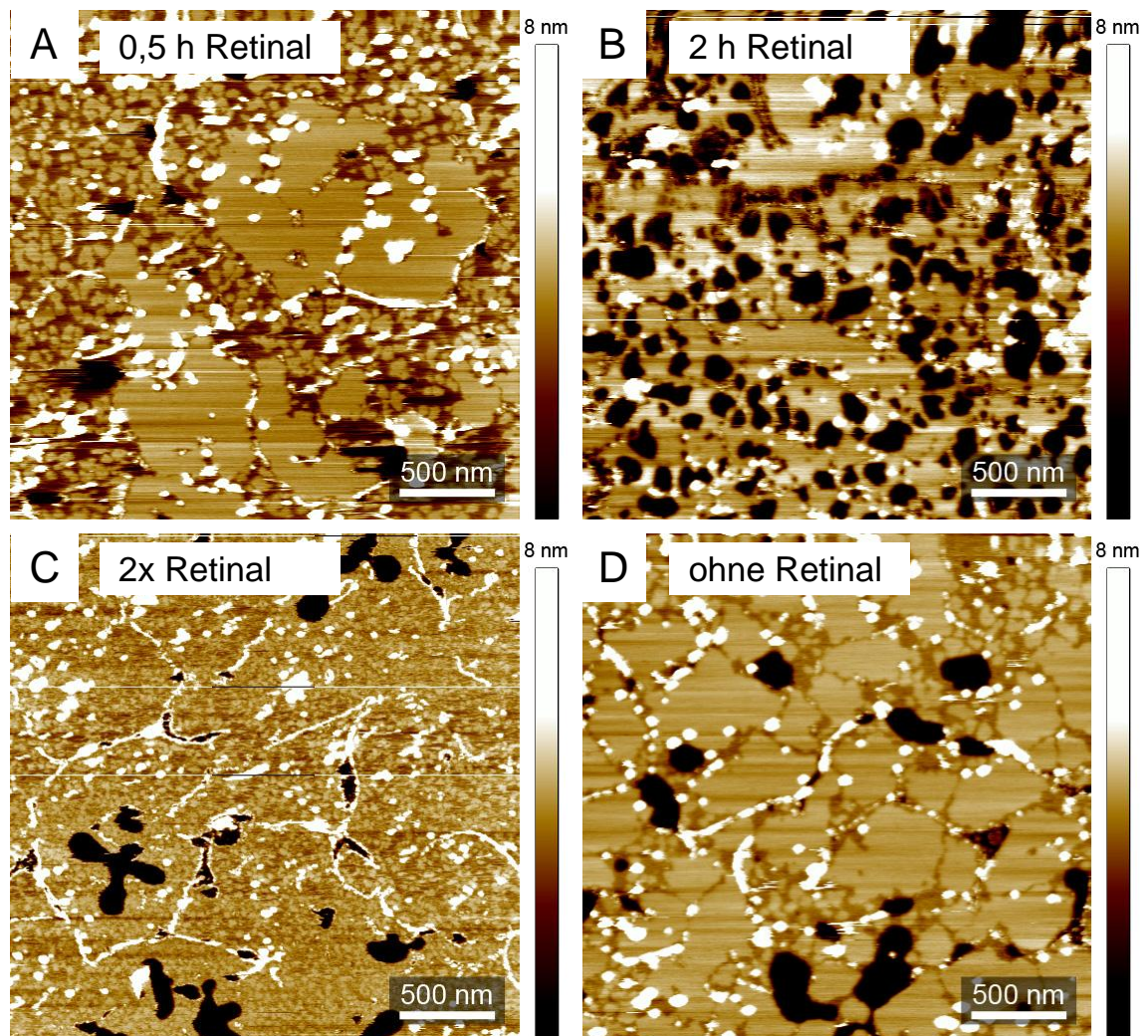


Abb. 3.26: Vergleich von unterschiedlichen Methoden der Apomembran-Regeneration. Hellbraune Bereiche kennzeichnen regenerierte PM, während dunkelbraune Bereiche auf nicht regenerierte oder denaturierte PM hinweisen. Die schwarzen Bereiche sind nicht mit PM bedeckter Glimmer. Weiße Punkte sind Bereiche, die höher sind als PM Monolagen. **A)** Die Apomembransuspension wurde auf Glimmer adsorbiert und mit 5 μ L ethanolischer Retinallösung (0,01 M) versetzt. Nach 30 min wurde mit Suspensionspuffer gewaschen und 16 h bei 65°C in Suspensionspuffer inkubiert. **B)** wie A, die Probe wurde nach 2 h gewaschen. **C)** Die Probe wurde anfangs wie in A beschrieben behandelt, mit Retinallösung versetzt (1 h), 16 h bei 65°C inkubiert und erneut mit Retinallösung behandelt (2 min) und 16 h bei 65°C inkubiert. **D)** Die auf Glimmer adsorbierten Apomembranen wurden 16 h bei 60°C in Suspensionspuffer inkubiert.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Erkenntnisse gewonnen, die die Strukturierung von Purpurmembranen auf festen Substraten ermöglichen. Dazu zählen die Erforschung der Morphologie von PM auf unterschiedlichen Substraten, die Orientierung der Membranen und die Fusion von PM zur Gewinnung von ausgedehnten PM-Monolagen.

Die Krümmung der BR-Mutanten D85N und D85T in alkalischen Lösungen wurden mittels Rasterkraftmikroskopie und Kraftspektroskopie untersucht. Dabei konnte die Theorie bestätigt werden, nach der die Membrankrümmung auf die Konformationsänderung der BR-Monomere während des Photozyklus zurückzuführen ist. Durch Einzelmolekülkraftspektroskopie wurde die Biegrichtung der D85X-Membranen identifiziert und gezeigt, dass die Kräfte, die zur Biegung der Membranen führen größer sind als die Wechselwirkungen zwischen PM und Oberfläche.

Eine neue Methode zur orientierten Immobilisierung von PM auf einer Oberfläche wurde in dieser Arbeit entwickelt. Die BR-Mutante Q3C, die durch genetische Modifikation eine Thiolgruppe an ihrem N-Terminus besitzt, wurde auf ultraglaten Goldsubstraten angebunden. Q3C-PM konnte nur mit seiner extrazellulären Seite eine Bindung zur Goldoberfläche eingehen, da der N-Terminus nur von dieser Membranseite zugänglich war. Die entgegengesetzt liegenden PMs konnten entfernt werden, so dass eine orientierte PM-Monolage erhalten wurde. Durch Einzelmolekül Kraftspektroskopie konnten die Seiten der angebundenen Q3C-PM identifiziert werden. Die Ergebnisse ließen auf einen hohen Grad an Orientierung der PMs schließen. Die an BR-Q3C aufgenommenen Kraftkurven zeigten einen zusätzlichen Peak, der durch die Gold-Cystein-Bindung verursacht wurde. Die Entfaltung der Helix A konnte so erstmals kraftspektroskopisch analysiert werden. Ein weiteres Ergebnis ergab sich aus der Analyse der Kraftkurven: Bei einem Teil der BR-Monomere wurden die transmembranen α -Helices nicht paarweise entfaltet. Diese Kraftkurven resultierten aus dem Entfalten der Helices A-C in einem simultanen Prozess.

Zur Fusion von PM auf Oberflächen wurde der Einfluss verschiedener Substrate auf die Morphologie der PM untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass der als Standardunterlage für PM und andere biologische Untersuchungsobjekte genutzte Glimmer große Auswirkungen auf die adsorbierten Biokomponenten hat. Es zeigte sich

bei Raumtemperatur und erhöhten Temperaturen eine fortschreitende Denaturierung der PMs von ihren Rändern aus. Diese Denaturierung kann auf Wechselwirkungen mit dem Substrat zurückgeführt werden, da PM in Suspension unter denselben Bedingungen stabil ist. Die Denaturierung konnte mit molekularer Auflösung und zeitaufgelöst beobachtet werden.

Durch Modifikation der Glimmeroberfläche mit Polyasparaginsäure konnte die Denaturierung verringert werden. Auch die Substrate Gold und Silicium hatten einen geringeren denaturierenden Effekt. Sowohl der modifizierte Glimmer als auch Gold und Silicium waren nur spärlich mit PM belegt. Attraktive und repulsive Kräfte, die bei der Adsorption von PM auf Oberflächen wirken werden in Kapitel 3.3.1 diskutiert. Diese Kräfte können einerseits zur Denaturierung der Probe führen, sind aber andererseits notwendig, um die PM auf der Oberfläche zu halten. Es zeigte sich, dass nur auf unbehandelten Glimmeroberflächen ein Belegungsgrad mit PM erreicht wurde, der eine Fusion der Purpurmbranen zu einer durchgehenden Monolage ermöglicht.

Gebliche Purpurmbranen wurden auf Glimmer abgeschieden und mit Retinal regeneriert. Diese Vorgehensweise führte zu einer polykristallinen Monolage. Die 50-100 nm großen kristallinen Bereiche wurden durch AFM-Untersuchungen mit molekularer Auflösung abgebildet. Dabei stellte sich heraus, dass die Bereiche zueinander verdrehte Orientierungen ihrer Kristallstruktur aufwiesen. Zeitaufgelöste Analysen zeigten die Beweglichkeit der Bereiche innerhalb der Membran.

Verbesserte Methoden zur Regeneration von PM auf Glimmeroberflächen wurden entwickelt, indem mehrere Faktoren, die auf die Regeneration der Membranen einwirkten untersucht wurden. Es stellte sich heraus, dass das Ethanol, das als Lösungsmittel des Retinals verwendet wurde, einen denaturierenden Effekt auf die Membranen hatte. Die Regeneration ohne Retinalzugabe führte zu kristallinen Bereichen mit einer Ausdehnung von mehreren hundert Nanometern. Durch die verbesserte Regeneration wurde ein Anteil an regenerierten Bereichen von ca. 2/3 der mit PM belegten Fläche erreicht.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse sind für viele Anwendungen von BR relevant, in denen eine Orientierung von PM oder ein Kontakt von PM-Monolagen mit einem Substrat nötig ist. Ein Lösungsansatz für das Problem der Denaturierung von PM wurde durch die Beeinflussung der Oberflächenwechselwirkungen gefunden. Neben der

Denaturierung sind jedoch auch der Belegungsgrad und die Desorption der Membranen zu beachten. Generell muss für Schnittstellen zwischen Biomolekülen und herkömmlicher Technik ein geeignetes Substrat gewählt werden, indem alle diese Faktoren berücksichtigt werden. Weitergehende Untersuchungen der komplexen Wechselwirkungen an Oberflächen sind für viele Bereiche der Biotechnologie von Interesse – auch eine weitere Verbesserung der Fusion von PM könnte von den gewonnenen Erkenntnissen profitieren.

5. Literatur

- [1] D. Oesterhelt, *The structure and mechanism of the family of retinal proteins from halophilic archaea*, Curr. Opin. Struct. Biol. **1998**, 8, 489-500.
- [2] W. Marwan and D. Oesterhelt, *Archaeal Vision and Bacterial Smelling*, ASM News **2000**, 66, 83-89.
- [3] D. A. Cisneros, D. Oesterhelt, and D. J. Müller, *Probing Origins of Molecular Interactions Stabilizing the Membrane Proteins Halorhodopsin and Bacteriorhodopsin*, Structure **2005**, 13, 235-242.
- [4] D. Oesterhelt and W. Stoeckenius, *Rhodopsin-like protein from purple membrane of halobacterium halobium*, Nature (London) New Biol. **1971**, 233, 149-154.
- [5] S. Subramaniam and R. Henderson, *Molecular mechanism of vectorial proton translocation by bacteriorhodopsin*, Nature **2000**, 406, 653-657.
- [6] Y. Shen, C. R. Safinya, K. S. Liang, A. F. Ruppert, and K. J. Rothschild, *Stabilization of the membrane protein bacteriorhodopsin to 140 °C in two-dimensional films*, Nature **1993**, 366, 48-50.
- [7] S. Mitaku, K. Ikuta, H. Itoh, R. Kataoka, M. Naka, M. Yamada, and M. Suwa, *Denaturation of bacteriorhodopsin by organic solvents*, Biophys. Chem. **1988**, 30, 69-79.
- [8] C. G. Brouillette, D. D. Muccio, and T. K. Finney, *pH dependence of bacteriorhodopsin thermal unfolding*, Biochemistry **1987**, 26, 7431-7438.
- [9] R. Henderson and P. N. T. Unwin, *Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy*, Nature **1975**, 257, 28-32.
- [10] N. Grigorieff, T. A. Ceska, K. H. Downing, J. M. Baldwin, and R. Henderson, *Electron-crystallographic Refinement of the Structure of Bacteriorhodopsin*, J. Mol. Biol. **1996**, 259, 393-421.
- [11] Y. Kimura, D. G. Vassilyev, A. Miyazawa, A. Kidera, M. Matsushima, K. Mitsuoka, K. Murata, T. Hirai, and Y. Fujiyoshi, *Surface of bacteriorhodopsin revealed by high-resolution electron crystallography*, Nature **1997**, 389, 206-211.
- [12] H. Luecke, H.-T. Richter, and J. K. Lanyi, *Proton Transfer Pathways in Bacteriorhodopsin at 2.3 Angstrom Resolution*, Science **1998**, 280, 1934-1937.
- [13] L.-O. Essen, R. Siegert, W. D. Lehmann, and D. Oesterhelt, *Lipid patches in membrane protein oligomers: Crystal structure of the bacteriorhodopsin-lipid complex*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **1998**, 95, 11673-11678.
- [14] H. Luecke, B. Schobert, H.-T. Richter, J.-P. Cartailler, and J. K. Lanyi, *Structure of Bacteriorhodopsin at 1.55 Å Resolution*, J. Mol. Biol. **1999**, 291, 899-911.

-
- [15] A. Corcelli, V. M. T. Lattanzio, G. Mascolo, P. Papadia, and F. Fanizzi, *Lipid-protein stoichiometries in a crystalline biological membrane: NMR quantitative analysis of the lipid extract of the purple membrane*, J. Lipid Res. **2002**, 43, 132-140.
- [16] M. Weik, H. Patzelt, G. Zaccai, and D. Oesterhelt, *Localization of Glycolipids in Membranes by In Vivo Labeling and Neutron Diffraction*, Mol. Cell **1998**, 1, 411-419.
- [17] C. Renner, B. Kessler, and D. Oesterhelt, *Lipid composition of integral purple membrane by ^1H and ^{31}P NMR*, J. Lipid Res. **2005**, 46, 1755-1764.
- [18] P. J. Booth, *Unravelling the folding of bacteriorhodopsin*, Biochim. Biophys. Acta **2000**, 1460, 4-14.
- [19] H. Houjou, K. Koyama, M. Wada, K. Sameshima, Y. Inoue, and M. Sakurai, *Effects of the protein electrostatic environment on the absorption maximum of bacteriorhodopsin*, Chem. Phys. Let. **1998**, 294, 162-166.
- [20] U. Haupts, J. Tittor, and D. Oesterhelt, *Closing in on Bacteriorhodopsin: Progress in understanding the molecule*, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. **1999**, 28, 367-399.
- [21] U. Haupts, J. Tittor, E. Bamberg, and D. Oesterhelt, *General Concept for Ion Translocation by Halobacterial Retinal Proteins: The Isomerization/Switch/Transfer (IST) Model*, Biochemistry **1997**, 36, 2-7.
- [22] S. Subramaniam and R. Henderson, *Crystallographic analysis of protein conformational changes in the bacteriorhodopsin photocycle*, Biochim. Biophys. Acta **2000**, 1460, 157-165.
- [23] F. Garczarek, S. B. Leonid, K. L. Janos, and K. Gerwert, *Proton binding within a membrane protein by a protonated water cluster*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **2005**, 102, 3633-3638.
- [24] A. Miller and D. Oesterhelt, *Kinetic optimisation of bacteriorhodopsin by aspartic acid 96 as an internal proton donor*, Biochim. Biophys. Acta **1990**, 1020, 57-64.
- [25] J. Tittor, D. Oesterhelt, and E. Bamberg, *Bacteriorhodopsin mutants D85N, D85T and D85,96N as proton pumps*, Biophys. Chem. **1995**, 56, 153-157.
- [26] J. Tittor, U. Haupts, C. Haupts, D. Oesterhelt, A. Becker, and E. Bamberg, *Chloride and Proton Transport in Bacteriorhodopsin Mutant D85T: Different Modes of Ion Translocation in a Retinal Protein*, J. Mol. Biol. **1997**, 271, 405-416.
- [27] N. Hampp, *Bacteriorhodopsin as a Photochromic Retinal Protein for Optical Memories*, Chem. Rev. **2000**, 100, 1755-1776.
- [28] N. A. Hampp and D. Oesterhelt, In *Nanobiotechnology: Concepts, Applications and Perspectives*, Wiley-VCH: Weinheim, Germany, **2004**, 146-167.
- [29] P. C. Pandey, *Bacteriorhodopsin – Novel biomolecule for nano devices*, Anal. Chim. Acta **2006**, 568, 47-56.

-
- [30] Y. Jin, T. Honig, I. Ron, N. Friedman, M. Sheves, and D. Cahen, *Bacteriorhodopsin as an electronic conduction medium for biomolecular electronics*, Chem. Soc. Rev. **2008**, 37, 2422-2432.
 - [31] N. Hampp and M. Neebe, *Bacteriorhodopsin-based Multi-level Optical Security Features*, SPIE-IS&T **2006**, 6075, 1-9.
 - [32] J. Pudewills, *Entwicklung und Charakterisierung photochromer Sicherheitsinkjettinten auf Basis von Bakteriorhodopsin*, Philipps-Universität Marburg **2009**.
 - [33] T. Fischer and N. A. Hampp, *Two-Photon Absorption of Bacteriorhodopsin: Formation of a Red-Shifted Thermally Stable Photoproduct F₆₂₀*, Biophys. J. **2005**, 89, 1175-1182.
 - [34] Z. Chen and R. R. Birch, *Protein-based artificial retinas*, TIBTECH **1993**, 11, 292-300.
 - [35] M. Frydrych, P. Silfsten, S. Parkkinen, J. Parkkinen, and T. Jaaskelainen, *Color sensitive retina based on bacteriorhodopsin*, BioSystems **2000**, 54, 131-140.
 - [36] M. Eisenbach, C. Weissmann, G. Tanny, and S. R. Caplan, *Bacteriorhodopsin-loaded charged synthetic membranes - Utilization of light energy to generate electrical current*, FEBS Lett. **1977**, 81, 77-80.
 - [37] T. Fischer and N. A. Hampp, *Purple membranes as microscaled nanopatterned biosubstrates for reversible attachment of biocomponents*, Soft Matter **2007**, 3, 707-712.
 - [38] J. Czege and L. Rheinisch, *Light-scattering changes during the photocycle of bacteriorhodopsin*, Acta Biochim. Biophys. Hung. **1987**, 22, 463-478.
 - [39] D. Porschke, *Strong Bending of Purple Membranes in the M-state*, J. Mol. Biol. **2003**, 331, 667-679.
 - [40] D. Rhinow and N. A. Hampp, *Light- and pH-Dependent Conformational Changes in Protein Structure Induce Strong Bending of Purple Membranes - Active Membranes Studied by Cryo-SEM*, J. Phys. Chem. B **2008**, 112, 13116-13120.
 - [41] D. Rhinow, *Purple membranes from Halobacterium salinarum as building blocks for nanobiotechnology: The importance of mechanical and thermal properties for matrix and surface applications*, Philipps-Universität Marburg **2008**.
 - [42] L. Keszthelyi, *Orientation of membrane fragments by electric field*, Biochim. Biophys. Acta **1980**, 598, 429-436.
 - [43] A. A. Kononenko, E. P. Lukashev, A. V. Maximychev, S. K. Chamorovsky, A. B. Rubin, S. F. Timashev, and L. N. Chekulaeva, *Oriented purple-membrane films as a probe for studies of the mechanism of bacteriorhodopsin functioning. I. The vectorial character of the external electric-field effect on the dark state and the photocycle of Bacteriorhodopsin*, Biochim. Biophys. Acta **1986**, 850, 162-169.
 - [44] J. Min, H.-G. Choi, J.-W. Choi, W. H. Lee, and U. R. Kim, *Photocurrent of bacteriorhodopsin films deposited by electrophoretic method*, Thin Solid Films **1998**, 327-329, 698-702.

-
- [45] S. B. Hwang, J. I. Korenbrot, and W. Stoeckenius, *Structural and Spectroscopic Characteristics of Bacteriorhodopsin in Air-Water Interface Films*, J. Membr. Biol. **1977**, 36, 115-135.
 - [46] T. Miyasaka, K. Koyama, and I. Itoh, *Quantum Conversion and Image Detection by a Bacteriorhodopsin-Based Artificial Photoreceptor*, Science **1992**, 255, 342–344.
 - [47] T. Miyasaka and K. Koyama, *Rectified photocurrents from purple membrane Langmuir-Blodgett films at the electrode-electrolyte interface*, Thin Solid Films **1992**, 210/211, 146-149.
 - [48] K. A. Fisher, K. Yanagimoto, and W. Stoeckenius, *Oriented adsorption of purple membrane to cationic surfaces*, J. Cell Biol. **1978**, 77, 611-621.
 - [49] H.-G. Choi, J. Min, W. H. Lee, and J.-W. Choi, *Adsorption behavior and photoelectric response characteristics of bacteriorhodopsin thin films fabricated by self-assembly technique*, Colloids Surf. B **2002**, 23, 327-337.
 - [50] J. A. He, L. Samuelson, L. Li, J. Kumar, and S. K. Tripathy, *Oriented Bacteriorhodopsin / Polycation Multilayers by Electrostatic Layer-by-Layer Assembly*, Langmuir **1998**, 14, 1674-1679.
 - [51] J. A. He, L. Samuelson, L. Li, J. Kumar, and S. K. Tripathy, *Bacteriorhodopsin Thin Film Assemblies-Immobilization, Properties, and Applications*, Adv. Mater. **1999**, 11, 435-446.
 - [52] M. L. Li, B. F. Li, and L. Jiang, *Long-Lived M-State in Multilayer Films Fabricated by Alternative Deposition of a Polycation and Bacteriorhodopsin*, Langmuir **2000**, 16, 5503-5505.
 - [53] D. J. Müller, M. Amrein, and A. Engel, *Adsorption of Biological Molecules to a Solid Support for Scanning Probe Microscopy*, J. Struct. Biol. **1997**, 119, 172-188.
 - [54] D. J. Müller, D. Fotiadis, S. Scheuring, S. A. Müller, and A. Engel, *Electrostatically Balanced Subnanometer Imaging of Biological Specimens by Atomic Force Microscope*, Biophys. J. **1999**, 76, 1101-1111.
 - [55] K. Koyama, N. Yamaguchi, and T. Miyasaka, *Antibody-Mediated Bacteriorhodopsin Orientation for Molecular Device Architectures*, Science **1994**, 265, 762–765.
 - [56] K. Koyama, N. Yamaguchi, and T. Miyasaka, *Molecular Organization of Bacteriorhodopsin Films in Optoelectronic Devices*, Adv. Mater. **1995**, 7, 590-594.
 - [57] D. Chen, Y. Lu, S. Sui, B. Xu, K. Hu, *Oriented Assembly of Purple Membrane on Solid Support, Mediated by Molecular Recognition*, J. Phys. Chem. B **2003**, 107, 3598-3605.
 - [58] D. J. Müller, C.-A. Schoenenberger, G. Büldt, and A. Engel, *Immuno-Atomic Force Microscopy of Purple Membrane*, Biophys. J. **1996**, 70, 1796-1802.
 - [59] F. Kienberger, H. Mueller, V. Pastushenko, and P. Hinterdorfer, *Following single antibody binding to purple membranes in real time*, EMBO reports **2004**, 5, 579-583.

-
- [60] D. J. Müller, G. Büldt, and A. Engel, *Force-induced Conformational Change of Bacteriorhodopsin*, J. Mol. Biol. **1995**, 249, 239-243.
- [61] S. Zhong, H. Li, X. Chen, E. Cao, G. Jin, and K. Hu, *Different Interactions between the Two Sides of Purple Membrane with Atomic Force Microscope Tip*, Langmuir **2007**, 23, 4486-4493.
- [62] H. F. Knapp, P. Mesquida, and A. Stemmer, *Imaging the surface potential of active purple membrane*, Surf. Interface Anal. **2002**, 33, 108-112.
- [63] M. Kessler and H. E. Gaub, *Unfolding Barriers in Bacteriorhodopsin Probed from the Cytoplasmic and the Extracellular Side by AFM*, Structure **2006**, 14, 521-527.
- [64] D.-C. Neugebauer, H. P. Zingsheim, and D. Oesterhelt, *Recrystallization of the Purple Membrane in Vivo and in Vitro*, J. Mol. Biol. **1978**, 123, 247-257.
- [65] T. R. Herrmann and G. W. Rayfield, *The Electrical Response to Light of Bacteriorhodopsin in Planar Membranes*, Biophys. J. **1978**, 21, 111-125.
- [66] N. Kahya, E.-I. Pecheur, W. P. de Boeij, D. A. Wiersma, and D. Hoekstra, *Reconstitution of Membrane Proteins into Giant Unilamellar Vesicles via Peptide-Induced Fusion*, Biophys. J. **2001**, 81, 1464-1474.
- [67] D. T. Kim, H. W. Blanch, and C. J. Radke, *Imaging of reconstituted purple membranes by atomic force microscopy*, Colloids Surf. B **2005**, 41, 263-276.
- [68] D. Oesterhelt, L. Schuhmann, and H. Gruber, *Light-Dependent Reaktion of Bacteriorhodopsin with Hydroxylamine in Cell Suspensions of Halobacterium Halobium: Demonstration of an Apo-Membrane*, FEBS Lett. **1974**, 44 (3), 257-261.
- [69] C. Möller, G. Büldt, N. A. Dencher, A. Engel, and D. J. Müller, *Reversible Loss of Crystallinity on Photobleaching Purple Membrane in the Presence of Hydroxylamine*, J. Mol. Biol. **2000**, 301, 869-879.
- [70] G. Kollbach, S. Steinmüller, T. Berndsen, V. Buss, and W. Gärtner, *The Chromophore Induces a Correct Folding of the Polypeptide Chain of Bacteriorhodopsin*, Biochemistry **1998**, 37, 8227-8232.
- [71] D. Oesterhelt and L. Schuhmann, *Reconstitution of Bacteriorhodopsin*, FEBS Lett. **1974**, 44 (3), 262-265.
- [72] R. Renthal and C. Alaniz, *Conformational change in bacterio-opsin on binding to retinal*, Biophys. Chem. **1999**, 78, 241-245.
- [73] P. Wagner, M. Hegner, H.-J. Güntherodt, and G. Semenza, *Formation and in Situ Modification of Monolayers Chemisorbed on Ultraflat Template-Stripped Gold Surfaces*, Langmuir **1995**, 11, 3867-3875.
- [74] D. Oesterhelt and W. Stoeckenius, *Halobacterium halobium and its fractionation into red and purple membrane*, Methods Enzymol. **1974**, 31, 667-678.

-
- [75] J. A. Burns, J. C. Butler, J. Moran, and G. M. Whitesides, *Selective Reduction of Disulfides by Tris(2-carboxyethyl)phosphine*, J. Org. Chem. **1991**, 56, 2648-2650.
- [76] K. Voitchovsky, S. A. Contera, M. Kamihira, A. Watts, and J. F. Ryan, *Differential Stiffness and Lipid Mobility in the Leaflets of Purple Membranes*, Biophys. J. **2006**, 90, 2075-2085.
- [77] M. Schranz, *Einzelmolekül-Kraftspektroskopie an mutierten Bakteriorhodopsinen*, Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg, **2004**
- [78] H. J. Butt, K. H. Downing, and P. K. Hansma, *Imaging the membrane protein bacteriorhodopsin with the atomic force microscope*, Biophys. J. **1990**, 58, 1473–1480.
- [79] D. J. Müller, F. A. Schabert, G. Büldt, and A. Engel, *Imaging Purple Membranes in Aqueous Solutions at Sub-Nanometer Resolution by Atomic Force Microscopy*, Biophys. J. **1995**, 68, 1681-1686.
- [80] D. J. Müller and A. Engel, *The Height of Biomolecules Measured with the Atomic Force Microscope Depends on Electrostatic Interactions*, Biophys. J. **1997**, 73 (3), 1633-1644.
- [81] A. Engel, C.-A. Schoenenberger, and D. J. Müller, *High resolution imaging of native biological samples using scanning probe microscopy*, Curr. Opin. Struct. Biol. **1997**, 7, 279-284.
- [82] D. J. Müller, J. B. Heymann, F. Oesterhelt, C. Möller, H. Gaub, G. Büldt, and A. Engel, *Atomic force microscopy of native purple membrane*, Biochim. Biophys. Acta **2000**, 1460, 27-38
- [83] D. J. Müller and A. Engel, *Strategies to prepare and characterize native membrane proteins and protein membranes by AFM*, Curr. Opin. Coll. Interf. Sci. **2008**, 13, 338-350.
- [84] F. Moreno-Herrero, J. Colchero, J. Gomez-Herrero, and A. M. Baro, *Atomic force microscopy contact, tapping, and jumping modes for imaging biological samples in liquids*, Phys. Rev. E **2004**, 69, 031915-1-031915-9.
- [85] C. Möller, M. Allen, V. Elings, A. Engel, and D. J. Müller, *Tapping-Mode Atomic Force Microscopy Produces Faithful High-Resolution Images of Protein Surfaces*, Biophys. J. **1999**, 77, 1150-1158.
- [86] M. Stark, C. Möller, D. J. Müller, and R. Guckenberger, *From Images to Interactions: High Resolution Phase Imaging in Tapping-Mode Atomic Force Microscopy*, Biophys. J. **2001**, 80, 3009-3018.
- [87] X. Zhuang and M. Rief, *Single-molecule folding*, Curr. Opinion Struct. Biol. **2003**, 13, 88-97.
- [88] D. J. Müller, N. Wu, and K. Palczewski, *Vertebrate Membrane Proteins: Structure, Function, and Insights from Biophysical Approaches*, Pharmacol. Rev. **2008**, 60, 43-78.
- [89] E.-L. Florin, V. T. Moy, and H. E. Gaub, *Adhesion Forces Between Individual Ligand-Receptor Pairs*, Science **1994**, 264, 415-417.

-
- [90] G. U. Lee, L. A. Chrisey, and R. J. Colton, *Direct Measurement of the Forces Between Complementary Strands of DNA*, Science **1994**, 266, 771-773.
 - [91] M. Rief, F. Oesterhelt, B. Heymann, and H. E. Gaub, *Single Molecule Force Spectroscopy on Polysaccharides by Atomic Force Microscopy*, Science **1997**, 275, 1295-1297.
 - [92] M. Rief, M. Gautel, F. Oesterhelt, J. M. Fernandez, and H. E. Gaub, *Reversible Unfolding of Individual Titin Immunoglobulin Domains by AFM*, Science **1997**, 276, 1109-1112.
 - [93] F. Oesterhelt, D. Oesterhelt, M. Pfeiffer, A. Engel, H. E. Gaub, and D. J. Müller, *Unfolding Pathways of Individual Bacteriorhodopsins*, Science **2000**, 288, 143-146.
 - [94] A. Kedrov, C. Ziegler, H. Janovjak, W. Kühlbrandt, and D. J. Müller, *Controlled Unfolding and Refolding of a Single Sodium-proton Antiporter using Atomic Force Microscopy*, J. Mol. Biol. **2004**, 340, 1143-1152.
 - [95] A. Kedrov, H. Janovjak, C. Ziegler, W. Kühlbrandt, and D. J. Müller, *Observing folding pathways and kinetics of a single sodium-proton antiporter from Escherichia coli*, J. Mol. Biol. **2006**, 355, 2-8.
 - [96] A. Kedrov, H. Janovjak, K. T. Sapra, and D. J. Müller, *Deciphering Molecular Interactions of Native Membrane Proteins by Single-Molecule Force Spectroscopy*, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. **2007**, 36, 233-260.
 - [97] M. Kessler, K. E. Gottschalk, H. Janovjak, D. J. Müller, and H. E. Gaub, *Bacteriorhodopsin Folds into the Membrane against an External Force*, J. Mol. Biol. **2006**, 357, 644-654.
 - [98] M. Rief and H. Grubmüller, *Kraftspektroskopie von einzelnen Biomolekülen*, Physikalische Blätter **2001**, 57 (2), 55-61.
 - [99] F. Oesterhelt, *Kraftinduzierte Sekundärstrukturänderungen in einzelnen Molekülen*, Ludwig-Maximilians-Universität München **2000**.
 - [100] D. Sarid: "Scanning Force Microscopy", **1991**, Oxford University Press, New York
 - [101] E.-L. Florin, M. Rief, H. Lehmann, M. Ludwig, C. Dornmair, V. T. Moy, and H. E. Gaub, *Sensing specific molecular interactions with the atomic force microscope*, Biosensors & Bioelectronics **1995**, 10, 895-901.
 - [102] J. L. Hutter and J. Bechhoeffer, *Calibration of atomic-force microscope tips*, Rev. Sci. Instrum. **1993**, 64 (7), 1868-1873.
 - [103] J. F. Marko and E. D. Siggia, *Stretching DNA*, Macromolecules **1995**, 28, 8759-8770.
 - [104] D. J. Müller, M. Kessler, F. Oesterhelt, C. Möller, D. Oesterhelt, and H. E. Gaub, *Stability of Bacteriorhodopsin α -Helices and Loops Analyzed by Single-Molecule Force Spectroscopy*, Biophys. J. **2002**, 83, 3578-3588.

-
- [105] N. A. Dencher, D. Dresselhaus, G. Zaccai, and G. Büldt, *Structural Changes in Bacteriorhodopsin during Proton Translocation Revealed by Neutron Diffraction*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **1989**, 86, 7876-7879.
 - [106] S. Subramaniam, M. Lindahl, P. Bullough, A. R. Faruqi, J. Tittor, D. Oesterhelt, L. Brown, J. Lanyi, and R. Henderson, *Protein Conformational Changes in the Bacteriorhodopsin Photocycle*, J. Mol. Biol. **1999**, 287, 145-161.
 - [107] W. Humphrey, A. Dalke, and K. Schulten, *VMD: Visual Molecular Dynamics*, J. Mol. Graphics **1996**, 14, 33-38.
 - [108] A. Giah, M. El Alaoui Faris, P. Bassereau, and T. Salditt, *Active membranes studied by X-ray scattering*, Eur. Phys. J. E **2007**, 23, 431-437.
 - [109] G. J. Turner, L. J. W. Miercke, T. E. Thorgeirsson, D. S. Kliger, M. C. Betlach, and R. M. Stroud, *Bacteriorhodopsin D85N: Three spectroscopic species in equilibrium*, Biochemistry **1993**, 32, 1332-1337.
 - [110] S. Rouhani, J.-P. Cartailler, M. T. Facciotti, P. Walian, R. Needleman, J. K. Lanyi, R. M. Glaeser, and H. Luecke, *Crystal Structure of the D85S Mutant of Bacteriorhodopsin: Model of an O-like Photocycle Intermediate*, J. Mol. Biol. **2001**, 313, 615-628.
 - [111] L. S. Brown, H. Kamikubo, L. Zimanyi, M. Kataoka, F. Tokunaga, P. Verdegem, J. Lugtenburg, and J. K. Lanyi, *A local electrostatic change is the cause of the large-scale protein conformation shift in bacteriorhodopsin*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA **1997**, 94, 5040-5044.
 - [112] Y. Kawase, M. Tanio, A. Kira, S. Yamaguchi, S. Tuzi, A. Naito, M. Kataoka, J. K. Lanyi, R. Needleman, and H. Saito, *Alteration of Conformation and Dynamics of Bacteriorhodopsin Induced by Protonation of Asp 85 and Deprotonation of Schiff Base as Studied by ¹³C NMR*, Biochemistry **2000**, 39 (47), 14472-14480.
 - [113] R. Ros, F. Schwesinger, D. Anselmetti, M. Kubon, R. Schäfer, A. Plückthun, and L. Tiefenauer, *Antigen binding forces of individually addressed single-chain Fv antibody molecules*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **1998**, 95, 7402-7405.
 - [114] F. Höök, M. Rodahl, B. Kasemo, and P. Brzezinski, *Structural changes in hemoglobin during adsorption to solid surfaces: Effects of pH, ionic strength, and ligand binding*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **1998**, 95, 12271-12276.
 - [115] M. C. Coen, R. Lehmann, P. Gröning, M. Biemann, C. Galli, and L. Schlappbach, *Adsorption and Bioactivity of Protein A on Silicon Surfaces Studied by AFM and XPS*, J. Colloid Interface Sci. **2001**, 233, 180-189.
 - [116] S. Adams, A. M. Higgins, and R. A. L. Jones, *Surface-Mediated Folding and Misfolding of Proteins at Lipid/Water Interfaces*, Langmuir **2002**, 18, 4854-4861.
 - [117] A. Sethuraman and G. Belfort, *Protein Structural Perturbation and Aggregation on Homogeneous Surfaces*, Biophys. J. **2005**, 88, 1322-1333.

-
- [118] M. B. Jackson and J. M. Sturtevant, *Phase Transitions of the Purple Membranes of Halobacterium halobium*, *Biochemistry* **1978**, 17 (5), 911-915.
- [119] V. L. Shnyrov and P. L. Mateo, *Thermal transitions in the purple membrane from Halobacterium halobium*, *FEBS* **1993**, 324, 237-240.
- [120] S. B. Hayward, D. A. Grano, R. M. Glaeser, and K. A. Fisher, *Molecular orientation of bacteriorhodopsin within the purple membrane of Halobacterium halobium*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, 75 (9), 4320-4324.
- [121] J. N. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces*, Academic Press, London, **1991**, Second Edition.
- [122] H.-J. Butt, *Measuring local surface charge densities in electrolyte solutions with a scanning force microscope*, *Biophys. J.* **1992**, 63, 578-582.
- [123] L. Chai and J. Klein, *Large Area, Molecularly Smooth (0.2 nm rms) Gold Films for Surface Forces and Other Studies*, *Langmuir* **2007**, 23, 7777-7783.
- [124] R. M. Pashley, *Hydration forces between mica surfaces in Li⁺, Na⁺, Na⁺ and Cs⁺ electrolyte solutions: a correlation of double layer and hydration forces with surface cation exchange properties*, *J. Colloid Interface Sci.* **1981**, 83, 531-546.
- [125] P. M. Dove and C. M. Craven, *Surface charge density on silica in alkali and alkaline earth chloride electrolyte solutions*, *Geochim. Cosmochim. Acta* **2004**, 69, 4963-4970.
- [126] D. G. Archer and P. Wang, *The Dielectric Constant of Water and Debye-Hückel Limiting Law Slopes*, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1990**, 19, 371-411.
- [127] L. Bergström, *Hamaker constants of inorganic materials*, *Adv. Colloid Interface Sci.* **1997**, 70, 125-169.
- [128] T. Ederth, *Computation of Lifshitz-van der Waals Forces between Alkylthiol Monolayers on Gold Films*, *Langmuir* **2001**, 17, 3329-3340.
- [129] M. P. Krebs and T. A. Isenbarger, *Structural determinants of purple membrane assembly*, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, 1460, 15-26.
- [130] Y. Mukohata, Y. Sugiyama, Y. Kaji, J. Usukura, and E. Yamada, *The white membrane of crystalline bacterioopsin in Halobacterium halobium strain R1mW and its conversion into purple membrane by exogenous retinal*, *Photochem. Photobiol.* **1981**, 33, 593-600.
- [131] M. Sumper and G. Herrmann, *Biogenesis of purple membrane: Regulation of bacterioopsin synthesis*, *FEBS Lett.* **1976**, 69, 149-152.
- [132] M. Sumper and G. Herrmann, *Studies on the Biosynthesis of Bacterio-opsin - Demonstration of the Existence of Protein Species Structurally Related to Bacterio-opsin*, *Eur. J. Biochem.* **1978**, 89, 229-235.

- [133] K. Hiraki, T. Hamanaka, T. Mitsui, and Y. Kito, *Formation of the two-dimensional hexagonal lattice of bacteriorhodopsin in reconstituted brown membrane*, Biochim. Biophys. Acta **1978**, 536, 318-322.
- [134] S. B. Hwang, Y. W. Tseng, and W. Stoeckenius, *Spontaneous aggregation of bacteriorhodopsin in brown membrane*, Photochem. Photobiol. **1981**, 33, 419-427.
- [135] R. Henderson, *The purple membrane from Halobacterium halobium*, Annu. Rev. Biophys. Bioeng. **1977**, 6, 87-109.
- [136] K. Hiraki, T. Hamanaka, T. Mitsui, and Y. Kito, *Phase transitions of the purple membrane and the brown holo-membrane - X-ray diffraction, circular dichroism spectrum and adsorption spectrum studies*, Biochim. Biophys. Acta **1981**, 647, 18-28.
- [137] I. Koltover, J. O. Raedler, T. Salditt, K. J. Rothschild and C. R. Safinya, *Phase Behavior and Interactions of the Membrane-Protein Bacteriorhodopsin*, Phys. Rev. Lett. **1999**, 82, 3184-3187.
- [138] M. Eisenbach, S. R. Caplan, and G. Tanny, *Interaction of purple membrane with solvents I. Applicability of solubility parameter mapping*, Biochim. Biophys. Acta **1979**, 554, 269-280.